RECOMMENDED PROCEDURE FOR THE IMPORTATION OF TEST ORGANISMS FOR SUBLETHAL TOXICITY TESTING

Method Development and Application Section
Environmental Technology Centre
Environment Canada

September 1999

RECOMMENDED PROCEDURE FOR THE IMPORTATION OF TEST ORGANISMS FOR SUBLETHAL TOXICITY TESTING

1.0 Application

The following procedures for the importation of test organisms are recommended by Environment Canada (EC) for sublethal tests performed using test organisms obtained from outside the testing laboratory. In this application, test organisms are imported into the testing laboratory for immediate use (i.e., without substantial acclimation and without in-house culturing) in sublethal toxicity tests.

This guidance document applies to test methods using test organisms which are purchased and transported from an external supplier (e.g., a commercial supplier) for immediate use in toxicity testing. Test methods which fall under this guidance include:

(a) the 7-day larval survival-and-growth test with fathead minnows *Pimephales promelas*, performed according to Environment Canada (EC, 1992a);

(b) the 7-day larval survival-and-growth test with the inland silverside fish *Menidia beryllina*, performed according to United States Environmental Protection Agency (USEPA,1994);

(c) the 7-day larval survival-and-growth test with the topsmelt fish *Atherinops affinis*, performed according to USEPA (1995);

(d) the 10-day survival-and-growth sediment test with freshwater midge larvae *Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*, performed according to EC (1997a); and

(e) the 14-day survival-and-growth sediment test with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*, performed according to EC (1997b).

This guidance document does not apply to the following two categories of test methods:

(1) those toxicity methods designed to use test organisms obtained from external sources, where adequate guidance on the importation of test organisms is already provided in the individual test method documents, including:

- organisms that are collected from wild populations and imported to the testing laboratory for immediate use in toxicity tests (e.g., the 10-day acute sediment test with marine or estuarine amphipods, performed according to EC, 1992b or 1998a);

- gametes or juveniles that are imported to the testing laboratory for use in toxicity tests (e.g., toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout), performed according to EC, 1998b); and acute lethality test using rainbow trout, performed according to EC,1990a); and

- adult organisms imported by the testing facility to provide gametes for use in toxicity tests (e.g., fertilization assay using echinoids (sea urchins or sand dollars), performed according to EC, 1992c).

(2) those toxicity test methods where the importation of organisms for immediate use in toxicity tests is not practical (i.e., cost effective) and in some cases, not possible, due to the nature and/or specificity of the quality, age, and/or acclimation requirements of the organisms to be used in a test. For these methods, test organisms must be cultured in the laboratory that is conducting the toxicity tests. Examples of such methods include:

- the 7-day growth-inhibition test using the freshwater macrophyte *Lemna minor*, performed according to EC (1999);

- the 72-hour growth-inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*, performed according to EC (1992d);

- the reproduction and survival test using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, performed according to EC (1992e);

- the sexual-reproduction test using the red macroalga, *Champia parvula*, performed according to USEPA (1994); and

- the acute lethality test using *Daphnia* spp., performed according to EC (1990b).

Guidance on the importation of broodstock organisms purchased or collected for the purpose of in-house culturing of toxicity test organisms is not provided in this document. Procedures related to in-house culturing of test organisms can be found in the respective test method documents.

Table 1 provides a summary of the required conditions and procedures for the importation of toxicity test organisms. Some of these items are in addition to those conditions and procedures detailed in specific test method documents.

Table 1 List of Required Conditions and Procedures for Importing Toxicity Test Organisms

Test Organisms	
Age	- must be known by the testing laboratory
Species	- must be identified by a qualified taxonomist for each species provided by a supplier on at least one occasion
Source	- must be from a dedicated culture which has met the health criteria and quality assurance requirements outlined in the test method
	- must be purchased from commercial suppliers or laboratories that maintain ongoing cultures of these organisms
Permits	- procurement, shipment and transfer of test organisms must be approved by provincial or federal authorities, where required
Organism Culturing	
Morbidity, Mortality and Treatment	- test organisms to be shipped to a laboratory for use in toxicity tests must be in good health (e.g., appear healthy and behave normally), be disease free, and show minimum mortality (as required in USEPA and EC test method documents)
	- any test organisms recovered from disease or previous exposure in a test must not be used in further sublethal toxicity tests
	- test organisms must be carefully observed by both supplier (prior to shipment) and testing laboratory (prior to use in a toxicity test) for a length of time which is reasonable for the species to ensure that they are disease free, behave normally, and in good physical condition.
	- individual(s) or batches of organisms where health is questionable must not be used in sublethal toxicity tests
Transport and Handling	
Temperature	- temperature of the test organisms must not change by more than 3°C in any 24-hour period while being transported
Dissolved Oxygen	- must be maintained at or above the minimum level required for organism culturing during transportation (e.g., ≈4.0 mg/L for inland silversides; > 6.0 mg/L for topsmelt; ≈80% saturation for *Hyalella azteca*, freshwater midges, and fathead minnows)
Crowding	- excessive crowding of animals must be avoided to minimize stress and prevent oxygen deficiency in transit
Handling	- organisms that are dropped, touch dry surfaces, or are injured during handling must be discarded and not used in testing

Acclimation and Holding

General	- upon arrival at the testing laboratory, the organisms must be acclimated as gradually as possible to the laboratory holding and/or testing conditions such that the test organisms are not stressed

Observations and Monitoring

General	- any requirements for monitoring water quality characteristics and other culture conditions such as temperature and salinity must be followed by the supplier, as specified in test method documents
	- the testing laboratory must establish an in-house system for evaluating the health of each shipment of organisms

Quality Control

Health Criteria	- test-organism health criteria, specified in individual test method documents must be followed
	- organisms must not be used for a test if they appear to be unhealthy, discolored, or otherwise stressed; fish larvae must not be used if they are not actively feeding and if their swimbladders are not inflated
	- mortality in a given batch of test organisms imported for use in toxicity tests must not exceed 10% for larval fish and freshwater midges and 20% for *Hyalella azteca* in the 24-hour period immediately preceding the test
Reference Toxicity Testing	- by the testing laboratory, on each batch of organisms imported for testing; reference toxicity testing procedures and the reference toxicant(s) used must meet the requirements outlined in specific test method documents
	- the testing laboratory must report any invalid reference toxicity test conducted concurrently with sample toxicity test(s) and must report the initiation and/or findings of a test system review
Test Control Performance	- organisms imported to the laboratory for testing must demonstrate acceptable performance in control solutions at the end of each test conducted, as specified in each specific test method document

2.0 Rationale

Test organisms should be cultured in the laboratory where the toxicity tests will be conducted (i.e., in-house), wherever it is practical and cost effective. If, however, in-house cultures cannot be maintained, test organisms should be purchased from a facility experienced in culturing organisms for use in toxicity tests (e.g., commercial supplier, government or private laboratory, etc.).

Organism sensitivity might vary with source, genetic history, age, sex, state of health, and stress associated with any recent environmental change (e.g., shipping) (EC, 1998c). Therefore, Environment Canada has decided to provide guidance herein on the use of test organisms that are not cultured by the laboratory conducting the toxicity tests, but are supplied by a facility independent of the testing laboratory for immediate use in sublethal toxicity tests.

3.0 Test Organisms

3.1 Species and Life Stage

The species used to characterize the toxicity of a sample will depend on the toxicity test method being followed, the requirements of the regulatory authority, and/or the objective of the test (USEPA, 1994).

Organisms used in a given toxicity test must be of known age, and should all be approximately the same age. Toxicity test organisms must be positively identified to species. Organisms that are purchased from a commercial supplier should be supplied with certification of the organisms' species identification, and the taxonomic reference (citation and page) or name(s) of the taxonomic expert(s) consulted. The identification of a representative specimen must be confirmed by a qualified taxonomist at least once for each species provided by the supplier. Thereafter, periodic confirmation of the species of test organism shipments can be conducted by the testing laboratory. This can be done by comparing an organism in a given batch to a representative specimen, previously confirmed by a taxonomist, which is kept on file (i.e., mounted on glass slides or preserved in ethanol) at the testing laboratory.

3.2 Source

All organisms used in a given toxicity test must be from a dedicated culture at a supplier's facility which has met the health criteria and quality assurance requirements outlined in the test method.

The source and condition of test organisms may affect the quality of the toxicity test data. Therefore, it is the responsibility of the testing laboratory to ensure that test organisms are purchased from commercial suppliers, culture collections, or other facilities experienced in the culturing of the specific test organisms required. The supplier must maintain an ongoing program

of quality assurance to provide high quality organisms. The program should incorporate quality control practices which include: regular health monitoring; performance evaluation of organisms through the use of standard reference toxicants; independent laboratory inspections; and adequate record keeping.

Larval fathead minnows, inland silversides, and topsmelt; chironomid instars or eggs; and juvenile *Hyalella* that are imported for immediate use in sublethal toxicity tests must be purchased from commercial suppliers or laboratories that maintain ongoing cultures of these organisms (EC, 1992a; 1997a; b; USEPA, 1994; 1995).

3.3 Permits

Moving animals and plants from one location to another raises serious questions of introducing non-native species and of transporting diseases and parasites. Any proposed procurement, shipment and transfer of test organisms must be approved, if required by provincial or federal authorities. Provincial governments might require a permit to import organisms whether or not the species is native to the area, or movements of aquatic organisms might be controlled by a Federal-Provincial Introductions and Transplant Committee. Advice on contacting the committee or provincial authorities and on sources of test organisms, can be obtained from the regional Environmental Protection Office (EC, 1992a). For example, in areas where fathead minnows are not native (B.C., P.E.I., N.S., Nfld., and parts of other provinces and territories), application for a permit must be made to the above-mentioned committee, to the appropriate provincial agency, or to the Regional Director-General of the Department of Fisheries and Oceans (DFO), depending on procedures in place locally (EC, 1992a).

Testing laboratories might be required to set-up a quarantine section within their facilities where imported organisms or gametes can be isolated and all equipment and fluids that come in contact with the test organisms or gametes can be sterilized and disposed of according to provincial or federal regulations. Standard operating procedures detailing quarantine operations and procedures might also be required by provincial agencies or DFO.

4.0 Organism Culturing

4.1 General

Instructions for culturing and/or holding each species of test organism are included in test-specific USEPA and amended Environment Canada sublethal toxicity test method documents. Some test methods (e.g., EC, 1992a) provide detailed guidance on culturing and/or maintaining toxicity test organisms (e.g., fathead minnow), whereas others (e.g., survival-and-growth tests using *Hyalella azteca* and freshwater midges) provide only general guidance and recommendations (EC, 1997a; b), leaving explicit directions regarding many aspects of culturing to the discretion and experience of the laboratory personnel. Where explicit culturing instructions are not provided, performance-based criteria are used to evaluate the suitability of the cultured organisms for tests and the

acceptability of the test results (see Section 8.0).

Regardless of the level of detail provided in the test method documents, the testing laboratory should ensure that the test organism supplier is aware of, and follows, all of the required and recommended conditions for test organism culturing specified in the respective toxicity test method documents. The testing laboratory must maintain on file the information on the culturing practices of the supplier. This may be accomplished in several ways. For example, the supplier could provide the laboratory with a standard operating procedure on their culturing procedures or a signed confirmation that they have been supplied with the relevant section of the applicable method document and that the methods are being followed. Another option is for the laboratory to audit the supplier's facility, collecting all of the culturing information to be maintained on file.

4.2 Facilities and Apparatus

The testing laboratory should ensure that the facilities and apparatus used by the supplier for culturing test organisms meet the "must" requirements specified in the test method documents. As required by Environment Canada (EC, 1997a; b), freshwater midges and *Hyalella azteca* must be cultured in a controlled temperature facility. Equipment for temperature control (i.e., incubator, recirculating water bath, or constant temperature room) must be adequate to maintain the temperature of the test organisms within the recommended limits (i.e., 23 ± 1°C for *Hyalella azteca* and *Chironomus riparius* or *C. tentans*). The culturing area must be isolated from any activities that might lead to contamination of the cultures, and must also be designed and constructed to prevent contamination of cultures (e.g., elimination of copper or galvanized piping or fixtures that could drip metal-contaminated condensates; use of filtered, oil-free air for aerating organism cultures) (EC, 1997a; b). These culturing conditions are also recommended for rearing larval fish (i.e., fathead minnows, topsmelt and inland silversides)(EC, 1992a; USEPA, 1994; 1995).

All equipment, containers, and accessories that might contact the organisms, or water within the culturing facility must be made of nontoxic materials (e.g., glass, type 316 stainless steel, porcelain, fibreglass, Teflon™, nylon, Nalgene™, polyethylene, polypropylene). Toxic materials such as copper, zinc, brass, galvanized metal, lead and natural rubber must not come in contact with apparatus, equipment, or culture water (EC, 1992a; 1997a; b; USEPA, 1994; 1995).

All culture chambers, handling equipment and supplies should be dedicated for use in culturing activities. All new materials should be leached in culture water before use. After use, all culture materials should be thoroughly cleaned and rinsed as appropriate. Cleaning procedures may range from simply washing with detergent to more complex procedures which include rinses with dilute acid (to remove scale, metals and bases) and/or acetone (to remove organic compounds), depending on what the degree of equipment contamination. In all cases, the final rinse should be with the same water in which the organisms are to be cultured. Recommended cleaning procedures are provided by USEPA (1994; 1995).

Organism holding tanks and associated handling equipment should be disinfected between

individual batches. However, since disinfectants are toxic, equipment should be thoroughly rinsed with water from the same source as that which will be used for culturing (EC, 1991; 1992a). Regular schedules for feeding and cleaning of organism enclosures should be established and should follow recommendations in specific test method documents (EC, 1991; 1992a; 1997a; b; USEPA 1994; 1995).

4.3 Water Quality

The quality of the water used for test organism culturing and for toxicity test dilution and control is extremely important. Water for these two uses should, ideally come from the same source (USEPA, 1994), however, in the case of test organism importation, this might not be feasible, and in most cases, is not possible. Most Environment Canada and USEPA test method documents outline the types of water recommended for test organisms culturing. Testing laboratories should ensure that the organism supplier maintains test organisms according to any recommended culture water conditions, specified in test method documents.

Where detailed culturing water quality characteristics are not specified in test method documents or where the organism supplier conducts water quality analyses on an infrequent basis, information (e.g., copy of supplier's water quality records) must be requested by the testing laboratory to ensure that culture water quality is sufficiently high to sustain satisfactory survival (EC, 1992a) and where applicable, growth and reproduction of the test species (EC, 1997a; b) (see Section 8.1).

Sources of water for culturing freshwater toxicity test organisms may be "uncontaminated" ground, surface, reconstituted, or, if necessary, may be dechlorinated municipal tap water. Culture water may also be prepared by diluting natural water with a high purity distilled or deionized water until a desired hardness is achieved (EC, 1992a; 1997a; b).

For marine toxicity test organisms, culture water may be natural seawater, or water made up from hypersaline brine derived from natural seawater, or artificial sea water prepared from reagent grade chemicals (GP2), or commercial artificial sea salts, as specifically recommended or required in respective toxicity test method documents (USEPA, 1994; 1995) and specific guidance on salinity adjustment prepared by Environment Canada (EC, 1997c).

Dechlorinated water is not recommended for use as culture and/or test water since its quality is often variable and it could contain unacceptably high concentrations of chlorine, chloramines, fluoride, copper, lead, zinc or other contaminants (EC, 1997a; b). In particular, dechlorinated municipal water should not be used for hatching fish embryos or rearing larvae since it is difficult to remove the last traces of residual chlorine and chlorinated organic substances which could be toxic to the larval fish (EC, 1992a). If, however, municipal drinking water is effectively dechlorinated to remove any harmful concentration of residual chlorine or chloramine (i.e., total residual chlorine (TRC) $\geq$0.002 mg/L, as recommended by the Canadian Council of Resource and Environment Ministers (CCREM, 1987) for the protection of freshwater aquatic life; and/or TRC $\geq$0.01 mg/L recommended by USEPA (1994; 1995) for marine organisms) and the water

has been previously demonstrated to support acceptable test organism performance, then dechlorinated water can be used.

If reconstituted water is used for test organism culturing, it should be prepared according to the recipes provided in test-specific method documents. If reconstituted water is to be used as dilution and control water for the 7-day fathead minnow survival and growth test, then adult fathead minnows providing embryos for the test must be acclimated to that reconstituted water or to a similar water for at least the five days immediately before embryos are obtained for the test. The similar water could be: (a) a natural water with hardness within 20% of the reconstituted water; (b) a harder natural water adjusted downwards to the desired hardness with deionized water; or (c) a softer natural water adjusted upwards with the appropriate quantities and ratio of reagent-grade salts. Without such acclimation, the benefit of a standardized dilution water might be lost (EC, 1992a).

If surface water is used for culturing, it should be filtered through a fine mesh net (i.e., $\leq$60µm) to remove potential predators or competitors. Water that might be contaminated with pathogens may be sterilized by passing it through an ultraviolet sterilizer (EC, 1992a; USEPA, 1994; 1995).

Water varies substantially from facility to facility in critical factors which can strongly affect test organisms and test responses. Water supply within a facility might also change periodically (EC, 1998c). Regular chemical monitoring and assessment of the supplier's culture water should be conducted to demonstrate the maintenance of acceptable water quality. Variables such as pH, total organic carbon, suspended solids, dissolved oxygen, total dissolved gases, temperature, ammonia nitrogen, nitrite, metals, pesticides, as well as residual chlorine (if municipal water is used); hardness, alkalinity, and conductivity (if freshwater is used); and salinity (if saltwater is used), should be routinely monitored in the culture water. Analyses should be conducted as frequently as necessary to document water quality (e.g., quarterly) and/or whenever difficulty is encountered in meeting minimum acceptability criteria for test organism health and/or control performance (EC, 1992a; 1997a; b; USEPA, 1994; 1995). Some parameters, such as temperature, dissolved oxygen, pH and salinity should be measured more regularly (preferably daily). For each analytical method used, the detection limit should be appreciably (e.g., 3 - 10 times) below either (a) the concentration in the water, or (b) the lowest concentration that has been shown to adversely affect the survival, growth, or development of the test species or other sensitive freshwater animals (EC, 1992e).

Detailed records of analyses conducted on the supplier's water quality should be maintained for comparison to maximum contaminant acceptance criteria established by the laboratory or the supplier (EC, 1998c; USEPA, 1994). Culture water-quality-criteria established by the supplier and/or the testing laboratory must be based on any existing criteria specified in each test method document (EC, 1991). Water supply treatment by activated carbon filtration, particle filtration, ultraviolet irradiation, ion exchange or reverse osmosis filtration might be required to meet culture water criteria established by the laboratory or the supplier. Water treatments and their rationale should always be identified by the supplier (e.g., in a Standard Operating Procedure)(EC, 1992a; 1997a; b; USEPA, 1994; 1995).

The water within the culture chambers should be renewed routinely. This can be accomplished manually or automatically using suitable apparatus and techniques for continuous or intermittent renewal (EC, 1992a; 1997a; b; USEPA, 1995).

4.4 Food Quality

The nutritional quality of the food used in culturing and testing fish and invertebrates is an important factor in the quality of the toxicity test data. Problems with the nutritional suitability of the food will be reflected in the survival, growth, and reproduction of the test organisms in cultures and toxicity tests. For example, the inconsistent fatty acid content of brine shrimp nauplii, *Artemia* that are used to feed newly hatched fathead minnows, inland silversides and topsmelt (EC, 1992a; USEPA, 1994; 1995) lead the USEPA (1994; 1995) to require each new batch of *Artemia* cysts be evaluated for size and nutritional suitability against known suitable reference cysts by performing a side-by-side larval growth test using the "new" and "reference" cysts.

For the culturing of invertebrates (freshwater midges and amphipods), the choice and quantity of commercial fish food to be added to each culture chamber and feeding frequency is left to the discretion and experience of the laboratory personnel, although the Environment Canada methods do provide some guidance on feeding invertebrate cultures (EC, 1997a; b).

If a batch of any food being used to maintain test organism cultures (fish or invertebrates) is suspected of being defective, the performance of organisms fed with the new food should be compared with the performance of organisms fed with a food of known quality in side-by-side tests. Short-term sublethal tests should be conducted which will determine the effect of food quality on growth or reproduction of each of the relevant test species in culture, using four replicates with each food source (USEPA, 1994; 1995). Suppliers maintaining cultures or test organisms should ensure that the nutritional quality of the food is supporting acceptable survival, growth and reproduction of the test organisms.

The nutritive quality of the food being used to culture test organisms can be tracked by maintaining records of food sources and success of rearing organism cultures, and by sharing information on any measured nutritive values with other culture facilities or laboratories (EC, 1992a).

It is also desirable to assess toxic contaminants in fish and invertebrate food, but particularly dry flake food and brine-shrimp eggs. Toxicants of concern are bioaccumulative metals and pesticides. New batches of food used in culturing should be analyzed for toxic organics and metals or whenever difficulty is encountered in meeting minimum acceptability criteria for control survival and reproduction of growth (USEPA, 1994). Guidance on which foods are acceptable and which are not can often be obtained from the experience of other laboratories, and the measurements that they have done.

Food supplies should be routinely monitored for trace contaminants, and records maintained for

comparison to minimum nutritional and maximum contaminant acceptance criteria (EC, 1998c). Criteria specified in test method documents (e.g., USEPA, 1994) should be considered in establishing laboratory criteria.

When foods other than the recommended food are used to maintain test organism, the foods must be evaluated. Side-by-side reference toxicity tests with the required food and the alternative food should be conducted. The results of these tests should meet the test acceptability requirements and should fall within the reference toxicant control limits for each species (see Section 8) if the food is to be considered adequate for culturing (USEPA, 1994; 1995).

4.5 Morbidity, Mortality and Treatment

Test organisms to be shipped to a testing laboratory for use in sublethal toxicity tests must be in good health, be disease free and show minimum mortality in culture tanks in the period of time preceding the test (i.e., as required in species-specific USEPA and EC test method documents). Test organisms must be carefully observed by the supplier, prior to shipment and by the testing laboratory, prior to use in a toxicity test, for a length of time which is reasonable for the species to ensure that they are disease free, behave normally, and in good physical condition (USEPA, 1994; 1995). Any organism(s) or batches of organisms where health is questionable must not be used in sublethal toxicity tests.

Treatment of test organisms with chemicals for disease prevention or control should be avoided, if possible. If the use of chemically-treated broodstock organisms cannot be avoided, a minimum amount of time (as specified in respective test method documents) must follow their treatment before their offspring can be used for tests (EC, 1992a).

In most toxicity testing laboratories, diseased animals are sacrificed immediately. Any test organisms recovered from disease or previous exposure in a test must not be used for further testing (EC, 1991).

5.0 Transport and Handling

All information needed to properly identify the test organisms transported to a testing laboratory must be provided with each shipment. Records accompanying each batch of test organisms must include, as a minimum: the quantity and source of test organisms in each shipment, supplier's name, age of the test organisms (i.e., date and time of hatching), date of arrival at the testing laboratory, arrival condition, and species identification. Data records of water quality and culture conditions should also be included.

The transportation of test organisms imported for immediate use in sublethal toxicity tests should be done in such a way to ensure that all required characteristics of the water and/or sediment, in which the organisms are shipped, are maintained during the transportation process.

To ensure that test organism health is maintained during transit, test organisms must be transported to the laboratory under proper temperature, dissolved oxygen, and where applicable, salinity conditions, as required by respective test method documents. For test organisms that will be used within the first 24 to 48 hours after arrival at the testing facility, the temperature of the water and/or sediment (and where applicable, the salinity) in which the organisms are being transported must be maintained at or near the required test conditions since there is little, if any time for acclimation upon arrival at the testing laboratory (see Section 6.0). The temperature of the test organisms must not change by more than 3°C in any 24-hour period during transportation.[1] Shipping containers should be insulated to minimize changes in water temperature during transit and depending on transport conditions and time, it might be necessary during transit to chill or warm the contents of the transport container(s) (EC, 1992 a). If the test organisms cannot be delivered on the same day that they are shipped, the transport containers containing the test organisms should be stored in such a way that the temperature of the test organisms is maintained. The temperature of the test organisms must be recorded upon departure from the supplier's facility and upon arrival at the testing laboratory.

Water used for transporting animals must be well oxygenated (e.g., 90 - 100% saturation) before shipment (EC, 1997a; b). During transportation, the dissolved oxygen level must be maintained at or above the minimum level required for organism culturing in the respective test method documents (e.g., ≈4.0 mg/L for inland silversides; > 6.0 mg/L for topsmelt; ≈80% saturation for *Hyalella*, freshwater midges, and fathead minnows). Adequate dissolved oxygen can be maintained by replacing the air above the water in the bags with oxygen from a compressed gas cylinder, and sealing the bags. Another method commonly used to maintain sufficient dissolved oxygen during shipment over short distances is to aerate with an airstone which is supplied from a portable pump (USEPA, 1994).

There are an infinite number of ways in which organisms might be transported to a testing laboratory from a commercial supplier (e.g., plastic bags or large-mouth screw-cap (500 mL) plastic bottles, coolers). Organisms should be transported to the laboratory using the source of water in which the organisms have been reared. Where applicable (i.e., for invertebrates), a suitable substrate should be provided (EC, 1997a; b). Excessive crowding of animals during shipment must be avoided to minimize stress (i.e., organisms must not appear stressed) and prevent oxygen deficiency (i.e., oxygen levels must be at or above the minimum level required for organism culturing, see previous paragraph) in transit.[2] For further information on the specifics of transportation and handling of test organisms, laboratories should consult reputable organism suppliers.

Some sublethal test method documents (e.g., USEPA 7-day larval survival-and-growth tests with

---

[1]For overnight transportation, temperature recorders can be used to monitor the temperature of shipped organisms. The BOXCAR system is a computer programmable temperature recorder which provides a temperature profile of the shipped contents (G. van Aggelen, personal communication).

[2]Where 1- to 8-day old *Hyalella azteca* are being transported to a testing laboratory, there should be less than 500 organisms per liter of water in the shipping container. Also, organisms should not be in sealed shipping containers for >24 hrs.

topsmelt and inland silverside) provide detailed guidance on importing test organisms for immediate use in toxicity tests.[3] In these cases, any required transport and handling conditions must be met, and, where provided, recommendations should be followed.

Organisms should be handled as little as possible. When handling is necessary, it should be done as gently, carefully, and quickly as possible to minimize stress (USEPA, 1994; 1995). Organisms that are dropped or touch dry surfaces or are injured during handling must be discarded (EC, 1997a; b; USEPA, 1994; 1995).

6.0 Acclimation and Holding

In order to ensure that the quality of imported test organisms is maintained upon arrival at the testing laboratory, proper conditions for the housing, handling and care of the organisms should be established and maintained at the testing facility. Where specified in test method documents, culturing/holding conditions must be the same as test conditions with respect to critical factors such as temperature, light, and photoperiod.

Test organisms that will be used within the first 24 to 48 hours after arrival at the testing facility should be cultured by the supplier in water that has similar qualities (e.g., temperature, pH, alkalinity, hardness, salinity) as the laboratory's control/dilution water, if possible.

Fathead minnows imported for use in sublethal toxicity tests should not be subjected to water temperature changes of > 3°C per day, whereas topsmelt, inland silversides, *Hyalella azteca* and freshwater midges should not be subjected to temperature changes > 2°C per day. For salinity, topsmelt and inland silverside should not be exposed to changes of more than 3 g/kg in any 12-hour period (EC 1992a; 1997a; b; USEPA, 1994; 1995). Adequate acclimation periods and rates, where required in test method documents must be followed.

Upon arrival at the laboratory the organisms must be acclimated to the laboratory holding conditions as gradually as possible, so that the stress of acclimation does not influence test results. Organisms should be held in the water and sediment used in transit while temperature adjustments are made. Alternatively, they may be transferred to well-oxygenated water similar in character to that from which they originated (i.e., were cultured), at the temperature of the water in the shipping container. Gradual exposure of organisms to the testing laboratory's culture water is recommended in all cases, but especially in instances where there is a marked difference in quality

---

[3]Silverside larvae are very sensitive to handling and shipping during the first week after hatching. For this reason, if organisms must be shipped to the test laboratory, it may be impractical to use larvae less than 11 days old because the sensitivity of younger organisms might result in excessive mortality during shipment. If organisms are to be shipped to a test facility, they should be shipped only as (1) early embryos, so that they hatch after arrival, or (2) after they are known to be feeding well on *Artemia* nauplii (8 - 10 days of age). Larvae shipped at 8 - 10 days of age would be 9 to 11 days old when the test is started. Larvae that are hatched and reared in the test laboratory can be used at 7 days of age (USEPA, 1994).

(e.g., hardness, pH, conductivity) from that to which they were previously acclimated. This should minimize any stress on the animals caused by different water quality characteristics. A useful procedure for acclimating test organisms is to hold them for 2 h in a 50:50 mixture of culture water:test water, then for 2 h in a 25:75 mixture of culture water:test water, followed by a final 2h in 100% test water before their introduction to test chambers (Ingersoll and Nelson, 1990). Another useful procedure is to siphon off 20 to 30% of the shipping water every 2 to 3 hours and replacing it with laboratory control/dilution water, ensuring that the temperature remains constant over this acclimation period. Acclimation should be started upon arrival at the testing facility. Ideally, test organisms (excluding fathead minnow larvae) should be in the laboratory's control/dilution water for 2 days prior to setting up a test.

7.0 Observations and Monitoring

As discussed in Section 4.3, the quality of water in culture chambers should be routinely monitored and recorded by the organism supplier. Any test method requirements for monitoring water quality characteristics and other culture conditions (e.g., temperature, salinity) must be followed by the supplier. Recommendations on culture observation and monitoring should also be carried out in accordance with the respective test method documents. As with culture water quality (see Section 4.3) acceptance criteria for environmental conditions such as temperature, light, water change rates and holding densities should be established based on conditions specified in the test method documents, and compliance should be monitored by the test-organism supplier on a regular basis.

The testing laboratory must establish an in-house system for evaluating the health (e.g., in the form of an SOP) of each shipment of organisms. The organisms should be observed carefully each day for signs of disease, contamination with other organisms, stress, physical damage, or mortality. Dead and abnormal organisms should be removed as soon as observed. It is not uncommon for some mortality (5 - 10%) to occur among imported test organisms during the first 48h in a holding tank because of individuals that refuse to feed (USEPA, 1994), therefore, it may be more appropriate to start monitoring pre-test mortality rates 24 hours after the organisms arrive at the testing facility (see Sections 4.5 and 8.1).

8.0 Quality Control

Performance-based criteria include: (a) those related to the survival and condition of cultured animals intended for use in the test (i.e., organism health criteria); (b) the performance of groups of animals in reference toxicity tests; and (c) criteria that must be met by control organisms during a test (i.e., test control performance) in order for that test to be valid. These performance-based criteria are often used to evaluate the suitability of the cultured organisms for tests, and the acceptability of test results, particularly where detailed organism culturing requirements are not specified in test method documents (EC, 1997a; b).

To be suitable for use in tests, supplier and/or in-laboratory cultures must have low mortalities,

and the cultured organisms must appear healthy, exhibit normal feeding and other behavior, and be of the appropriate age and size before shipment to a laboratory and prior to initializing a test. Tests properly utilizing randomization procedures along with required and suggested quality control standards retain many built-in checks of typical organism response. A commonly used indicator of organism health includes individual test acceptability criteria. The acceptability of the culture should also be demonstrated by concurrent or ongoing tests using one or more reference toxicants.

8.1 Test-organism Health Criteria

Both subjective and objective indicators of organism health are available in the toxicity test method documents (USEPA, 1990). Test-organism health criteria, specified in individual test method documents must be followed. Indicators of good health include: normal activity and behavior, active feeding, and good color. A group of organisms must not be used for a test if they appear to be unhealthy, discolored, or otherwise stressed. Fish larvae must not be used if they are not actively feeding and if their swimbladders are not inflated. Mortality in a given batch of test organisms imported for immediate use in sublethal toxicity tests must not exceed 10% for larval fish and freshwater midges and 20% for *Hyalella azteca* in the 24-hour period immediately preceding the test. If a batch of organisms fails to meet these criteria, it should be humanely destroyed and a new batch obtained (OECD, 1992; EC, 1997a; b; USEPA, 1994; 1995). Organisms should be treated with due care and where applicable, humanely destroyed according to guidelines established by the Canadian Council on Animal Care (CCAC, 1984; 1993).

8.2 Reference Toxicity Testing

In addition to test-organism health criteria, the health of test organisms must be documented by periodic use of reference toxicity testing (USEPA, 1990). The routine use of a reference toxicant or toxicants is necessary to assess, under standardized test conditions the relative sensitivity of the organism culture(s), and the precision and reliability of data produced by the laboratory (EC, 1992a; 1997a; b). It is the responsibility of the testing laboratory to demonstrate the relative sensitivity of the individual batch of organisms used in a given toxicity test as well as its ability to obtain consistent precise results using one or more reference toxicants.

The quality of test organisms from outside sources must be verified by conducting reference toxicity tests. When a laboratory imports test organisms from an outside source for immediate use in sublethal toxicity tests, the sensitivity of each batch of test organisms must be determined with a reference toxicity test.[4] Reference toxicity testing procedures and the reference toxicant(s)

[4]This frequency of reference toxicity testing differs from the monthly reference tests specified in test method documents for organisms being cultured in-house, since culture conditions at a commercial supplier are not necessarily controlled/monitored as thoroughly as they would be if cultured in-house (i.e., in the testing facility). Also, transport and handling conditions will differ every time test organisms are shipped to the testing laboratory, thereby introducing unknown variability with each batch of test organisms received at the testing facility.

used must meet the requirements outlined in specific test method documents. The test using the reference toxicant is most useful when carried out simultaneously with an actual toxicity test. Therefore, when toxicity tests are performed with effluents, receiving waters, chemicals, or sediments using test organisms obtained from outside the test laboratory, reference toxicity tests of the same type (except for sediment tests where the reference toxicity tests consist of 96-hour water-only tests) should be performed concurrently.

An organism supplier who maintains a culture of the test organisms should provide a warning chart with data from at least the last five monthly sublethal toxicity tests using the same reference toxicant and an outline of the test conditions used in the reference testing.

If a routine reference toxicity test performed in the testing laboratory fails to meet test acceptability criteria (e.g., control survival, growth, reproduction), or falls outside the control limits of the warning chart, the laboratory should undertake an investigation into the cause of the test results falling outside the control limits (EC, 1990c). The investigation should include a review of the test system and further reference toxicity testing (if possible). The laboratory's investigation should also include, as a minimum, a review of: the quality data provided by the organism supplier; the methodology and conditions under which the organisms were cultured; and the shipping conditions. If the failed reference toxicity test was being performed concurrently with effluent, receiving water, chemical, or sediment toxicity tests, then the laboratory must report the failed reference toxicity test, the results of a repeated reference toxicity test (if performed), and the findings of the test system investigation.

8.3 Test Control Performance

The organisms imported to the laboratory for testing must also demonstrate "acceptable" performance in control solutions, at the end of each test conducted. Specific control acceptance criteria are outlined in each specific test method document. Control performance criteria might include maximum levels of test-organism mortality and abnormal behavior, and minimum levels of sublethal endpoints such as growth, reproduction, and egg fertilization.

If test organisms have been cultured in water that is different from test control/dilution water, most test methods (e.g., Environment Canada's 7-day survival and growth test using fathead minnows) require the inclusion of a second set of controls using culture water (EC, 1992a).

9.0 Reporting and Record-Keeping

Specific information on the test organisms used in a given sublethal toxicity test must be obtained from an organism supplier in accordance with the reporting requirements sections of USEPA and amended Environment Canada test method documents. The "Reporting Requirements" section of the amended Environment Canada biological test method documents includes two lists of information items relevant to test organisms. The first list that appears in the "Minimum Requirements for a Test-specific Report" section contains information items pertaining to test

organisms that must be included in each test-specific report and therefore must be obtained from the test-organism supplier with every batch of test organisms. Information pertaining to test organisms listed in the "Additional Reporting Requirements" section must be obtained from the organisms supplier for inclusion in test-specific reports or for inclusion in the testing laboratory's records. For USEPA methods, Environment Canada has published minimum reporting requirement documents that outline the specific test-organism information that is required in each test report under Environmental Effects Monitoring programs for the pulp and paper and metal mining industries (EC, 1998d; e).

9.1 Minimum Reporting Requirements

In addition to the information required in the "Minimum Requirements for Test-specific Report" section of specific test method documents, the following list of items must be provided by the test organism supplier and/or obtained by the testing laboratory with every batch of test organisms shipped to the testing laboratory.

9.1.1 Test Organism

- name and address of test organism supplier
- age of test organism (i.e., date and time of hatching)

9.1.2 Culturing

- any deviations from specific test method "must" requirements for culturing of test organisms; facilities and apparatus used for culturing test organisms; and culture/holding water conditions
- any unusual appearance or behavior, and mortality rates of broodstock and test organisms observed by supplier; any disease occurrence

9.1.3 Transport and Handling

- temperature, DO, and salinity (where applicable) of water and/or sediment in which organisms are shipped, prior to being shipped and upon arrival at the testing laboratory
- any unusual appearance or behavior of test organisms upon arrival at the testing laboratory

9.1.4 Acclimation

- brief description of test organism acclimation rate and procedure (at the testing laboratory)

9.1.5 Quality Control

- data showing that required test organism health criteria were met
- any unusual appearance or behavior of organisms in the period immediately preceding a toxicity test (record the period of time relative to test initiation in which the observations were made); for fish larvae, brief confirmation of inflated swimbladders and normal feeding behavior
- data showing test organism mortality rates upon arrival of test organism at the test laboratory, as well as during the period (e.g., 24 hours) immediately preceding a toxicity test
- the results and duration of the toxicity test with a reference toxicant(s) for each batch of test organisms used in a sublethal toxicity test, together with the geometric mean value (± 2 SD) for the same reference toxicant(s) as derived at the test facility in previous tests

9.2 Additional Reporting Requirements

In addition to the information required in the "Additional Reporting Requirements" section of specific test method documents, the following list of items must be obtained from the organisms supplier and/or maintained by the testing laboratory on file for a period of five years.

9.2.1 Test Organism

- certification of species identification; taxonomic reference (citation and page) or name(s) of the taxonomic expert consulted in the identification of test organisms
- any health certificates
- origin of broodstock, for laboratory cultured test organisms
- detailed description of health care and disease treatment
- permit from provincial or regional authorities for procurement, shipment and transfer of test organisms, where required;

9.2.2 Culturing

- detailed description of supplier's culturing facilities and procedures
- acceptance criteria for organism food, water quality and other environmental conditions such

as temperature, pH, light, DO, water change rates and holding densities

- results of food(s) evaluation, if food(s) differs from that recommended in test method document(s) or from food(s) previously evaluated and found to be acceptable

- results of chemical analyses conducted on culture/holding water, organism food and other environmental conditions

- any broodstock or test organisms treated with or exposed to chemicals (i.e., for disease treatment or preventative treatment)

9.2.3 Transport and Handling

- number of organisms, size, and volume of water and/or sediment per shipping container

9.2.4 Acclimation

- details of acclimation rate and procedures, including conditions under which organisms were held by the supplier, laboratory condition to which organisms were acclimated and the rate and method of acclimation

9.2.5 Observation and Monitoring

- nature and timing of all monitoring performed

- records of required monitoring of organism cultures (e.g., water quality characteristics, temperature, salinity)

- description of laboratory's system for evaluating the health of each shipment of test organisms

9.2.6 Quality Control

- a copy of the organism supplier's reference toxicant warning chart for test organisms maintained in culture; an outline of the test conditions used in the reference testing

10.0 Acknowledgments

This procedure document was written by J.A. Miller (Miller Environmental Sciences Inc., Stroud, ON). Mr. R.P. Scroggins (Environmental Technology Centre, Environment Canada, Gloucester, ON) acted as Scientific Authority and provided technical input and guidance throughout the work. Special acknowledgment is made of the many useful comments and suggestions provided by the following persons who reviewed the draft document: A. Borgmann (Environment Protection Branch, Ontario Region - EC, Toronto, ON) for her guidance on invertebrate transport and handling; J. Bruno (Pacific Environmental Science Centre, Pacific and Yukon Region - EC, North Vancouver, BC); K. Doe (Environmental Conservation Branch, Atlantic Region - EC, Moncton, NB); E. Jonczyk (Beak International Inc., Brampton, ON); C. McPherson (EVS Environment Consultants, North Vancouver, BC); J. Pickard (BC Research, Vancouver, BC); D. Rodrigue (Environment Canada, Gloucester, ON); J. Stewart (EVS Environment Consultants, North Vancouver, BC); B.J. Unis (HydroQual Laboratories Ltd., Calgary AB); and G. van Aggelen (Pacific Environmental Science Centre, Pacific and Yukon Region - EC, North Vancouver, BC.

11.0 References

CCAC (Canadian Council on Animal Care), "Guide to the Care and Use of Experimental Animals", Vol 2, Ottawa, ON (1984).

CCAC (Canadian Council on Animal Care), "Guide to the Care and Use of Experimental Animals", Vol 1, 2nd Edition, Ottawa, ON (1993).

CCREM (Canadian Council of Resource and Environment Ministers), "Canadian Water Quality Guidelines", Task Force on Water Quality Guidelines, Environment Canada, Ottawa, ON (1987).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Rainbow Trout", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/9, 51p. (1990a).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp.", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/11, 57p. (1990b).

EC (Environment Canada), "Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/12, 85 p. (1990c).

EC (Environment Canada), "Quality Assurance Guidelines for Biology in Aquatic Environment Protection", (Prepared by Beak Consultants Ltd.) National Water Research Institute, Burlington, ON, (1991).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/22, 70

p. (1992a), Amended in November, 1997.

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Acute Test for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Amphipods", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/26, 83 p. (1992b), Amended in October 1998.

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/27, 97 p. (1992c), Amended in November 1997.

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/25, 41p. (1992d), Amended in November, 1997.

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/21, 73 p. (1992e), Amended in November, 1997.

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment Using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*)", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/32, 131 p. (1997a).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment Using the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca*", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/33, 123 p. (1997b).

EC (Environment Canada), "Recommended Procedure for Adjusting Salinity of Effluent Samples for Marine Sublethal Toxicity Testing Conducted Under Environmental Effects Monitoring (EEM) Programs", Conservation and Protection, Ottawa, ON, 5 p. (1997c).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Sediment to Marine or Estuarine Amphipods", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/35, 57p. (1998a).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout)", 2nd Edition, Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/28, 102 p. (1998b).

EC (Environment Canada), "Technical Guidance Document for Aquatic Environmental Effects Monitoring Related to Federal *Fisheries Act* Requirements", Environment Canada, Hull, P.Q., 282 p. (1998c).

EC (Environment Canada), "Environment Canada Minimum Reporting Requirements - Inland Silverside Larval Growth and Survival Test", Conservation and Protection, Ottawa, ON, 2 p. (1998d).

EC (Environment Canada), "Environment Canada Minimum Reporting Requirements - Topsmelt Larval Growth and Survival Test", Conservation and Protection, Ottawa, ON, 2 p. (1998e).

EC (Environment Canada), "Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*", Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/37, 106 p. (1999).

Ingersoll, C.G. and M.K. Nelson, "Testing Sediment Toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera)", p. 93 - 109 in : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, W.G. Landis and W.H. van der Schalle (eds). 13th Volume, ASTM SPT 1096, ASTM, Philadelphia, PA (1990).

QECD (Organization for Economic Co-Operation and Development), "The OECD Principles of Good Laboratory Practice", OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, Number 1, Environment Monograph No. 45, OECD, Paris, France, 29 p. (1992).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), "Manual for the Evaluation of Laboratories Performing Aquatic Toxicity Tests", (Prepared by D.J. Klemm, L.B. Lobring, and W.H. Horning II), Office of Research and Development, Report EPA 600/4-90/031, USEPA, Cincinnati, Ohio, 109 p. (1990).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), "Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms", 2nd Edition. D.J. Klemm, G.E. Morrison, T.J. Norberg-King, and W.H. Peltier (eds.). Office of Research and Development, Report EPA 600/4-91/003, USEPA, Cincinnati, OH, 439 p. (1994).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), "Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms", G.A. Chapman, D.L. Denton, and J.M. Lazorchak (eds.), Office of Research and Development, Report EPA 600/R-95-136, USEPA, Cincinnati, OH, 661 p. (1995).

PROCÉDURE RECOMMANDÉE POUR L'IMPORTATION D'ORGANISMES DESTINÉS À DES ESSAIS DE TOXICITÉ SUBLÉTALE

Section de l'élaboration de méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada

Septembre 1999

PROCÉDURE RECOMMANDÉE POUR L'IMPORTATION D'ORGANISMES DESTINÉS À DES ESSAIS DE TOXICITÉ SUBLÉTALE

1.0 Application

Environnement Canada (EC) recommande de suivre les procédures suivantes pour l'importation d'organismes destinés à des essais de sublétalité conduits avec des organismes provenant de sources autres que le laboratoire d'essai. Dans cette application, les organismes d'essai sont importés au laboratoire d'essai pour utilisation immédiate dans des essais de toxicité – c.-à-d., sans subir une acclimatation prolongée et sans être cultivés au laboratoire.

Ce document d'orientation s'applique aux méthodes d'essais utilisant des organismes qui sont achetés et transportés par un fournisseur externe (par exemple, un fournisseur commercial) pour utilisation immédiate dans des essais de toxicité. Les méthodes auxquelles s'appliquent ces recommandations comprennent :

a) Essai de survie et de croissance des larves de Tête-de-boule *Pimephales promelas* sur 7 jours, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1992a).

b) Essai de survie et de croissance des larves de Capucette *Menidia beryllina* sur 7 jours (7-day larval survival-and-growth test with the inland silverside fish *Menidia beryllina*) conduit selon la méthode de l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA, 1994).

c) Essai de survie et de croissance des larves d'Éperlan d'eau douce – *Atherinops affinis* sur 7 jours (7-day larval survival-and-growth test with the topsmelt *Atherinops affinis*) conduit selon la méthode de l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA, 1995).

d) Essai de survie et de croissance de larves dulcicoles de Chironomes *Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius* dans les sédiments, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1997b).

e) Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1997b).

Ce document d'orientation ne s'applique pas aux deux catégories de méthodes d'essai suivantes :

1) Méthodes d'essais de toxicité conduits avec des organismes d'essai obtenus de sources externes et pour lesquelles des lignes directrices adéquates pour l'importation des organismes d'essai sont déjà fournies dans les documents relatifs à la méthode d'essai concernée, y compris :

   - les organismes qui sont prélevés de populations sauvages et importés dans le laboratoire d'essai pour utilisation immédiate dans les essais de toxicité (p. ex., l'essai de 10 jours de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC 1992b ou 1998a);

- gamètes ou juvéniles importés au laboratoire d'essai pour utilisation dans des essais de toxicité, p. ex., essai de toxicité sur des stades précoces de salmonidés (Truite arc-en-ciel) conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1998b), et essai de létalité aiguë avec la Truite arc-en-ciel, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1990b);

- organismes adultes importés par le laboratoire d'essai pour obtenir des gamètes pour utilisation dans des essais de toxicité, p. ex., essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats) conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1992c).

2) Méthodes d'essai de toxicité pour lesquelles l'importation d'organismes pour emploi immédiat dans des essais de toxicité ne convient pas (c.-à-d. n'est pas économiquement rentable) ou s'avère parfois impossible en raison de la nature et (ou) de la spécificité de la qualité, de l'âge et (ou) des exigences d'acclimatation des organismes destinés à l'essai. Pour ces méthodes, les organismes d'essai doivent être cultivés au laboratoire où sont conduits les essais de toxicité. Les méthodes en question comprennent :

- Essai d'inhibition de croissance sur 7 jours du macrophyte *Lemna minor*, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1999);

- Essai d'inhibition de croissance sur 72 heures de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*, conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1992d);

- Essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*, conduit selon la méthode d Environnement Canada (EC, 1992e);

- Essai de reproduction sexuée sur la micro-algue rouge *Champia parvula*, (Sexual reproduction test using the red microalga, *Champia parvula)* au moyen de la méthode de l'Ag nce américaine de protection de l'environnement (USEPA, 1994);

- Essai de létalité aiguë avec *Daphnia* spp., conduit selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1990b).

Le présent document ne concerne pas l'importation d'organismes reproducteurs achetés ou recueillis à des fins de culture, dans le laboratoire même, d'organismes destinés à des essais de toxicité. Les modalités pour la culture des organismes d'essai au laboratoire d'essai sont indiquées dans les documents se rapportant aux méthodes d'essai respectives.

Le tableau 1 résume les conditions requises et les procédures pour l'importation d'organismes devant servir dans des essais de toxicité. Ce tableau contient certains points qui ne sont pas couverts dans les conditions et procédures détaillées des documents relatifs à une méthode particulière.

Tableau 1 Conditions requises et procédures pour l'importation d'organismes devant servir à des essais de toxicité

Organismes d'essai	
Âge	- Doit être connu par le laboratoire d'essai
Espèce	- Chaque espèce achetée d'un fournisseur doit être identifiée à une occasion au moins par un taxinomiste spécialisé
Source	- Doivent provenir d'une culture spécifique (voir section 3.2) qui a répondu à tous les critères de santé et les exigences en matière d'assurance de la qualité précisés dans la méthode d'essai - Doivent être achetés de fournisseurs commerciaux ou de laboratoires qui entretiennent en continu des cultures de ces organismes
Permis	- L'obtention, l'expédition et le transfert des organismes d'essai doivent être approuvés par les autorités provinciales ou fédérales, lorsque requis
Culture des organismes	
Morbidité, mortalité et traitement	- Les organismes d'essai à expédier à un laboratoire pour utilisation dans des essais de toxicité doivent être en bonne santé (p. ex., paraître en bonne santé et avoir un comportement normal), n'être porteurs d'aucune maladie et démontrer un taux de mortalité minimum (tel que requis dans les documents relatifs aux méthodes d'essai de l'USEPA et d'Environnement Canada) - Les organismes d'essai qui se sont rétablis d'une maladie ou qui ont déjà été soumis à un essai ne doivent pas être utilisés dans d'autres essais de toxicité sublétale - Les organismes d'essai doivent être méticuleusement examinés par le fournisseur (avant l'expédition) et le laboratoire d'essai (avant leur utilisation dans un essai de toxicité) pendant une période jugée raisonnable pour l'espèce, afin de s'assurer qu'ils ne sont porteurs d'aucune maladie, qu'ils se comportent normalement, et qu'ils sont en bonne état physique - Tout organisme ou lot d'organismes dont la santé est douteuse ne doivent pas être utilisés dans des essais de toxicité sublétale
Transport et manutention	
Température	- Durant le transport, la température des organismes d'essai ne doit pas varier de plus de 3 °C à l'intérieur d'une période de 24 heures
Oxygène dissous	Durant le transport, doit être maintenu à la teneur minimum ou au-dessus de la teneur exigée pour la culture des organismes (p. ex., >4,0 mg/L pour la Capucette; > 6,0 mg/L pour l'Éperlan d'eau douce; >80 % de saturation pour *Hyalella azteca*, les chironomes dulcicoles et les Tête-de-boule)
Densité	- Une trop forte densité d'organismes doit être évitée pour minimiser le stress et prévenir un déficit en oxygène en cours de transport

Manipulation	- Les organismes qu'on laisse tomber, qui touchent des surfaces sèches ou qui sont blessés lors de la manipulation doivent être écartés et ne pas être utilisés pour l'essai
Acclimatation et détention	
Généralités	- À l'arrivée au laboratoire d'essai, les organismes doivent être acclimatés aussi progressivement que possible aux installations de détention du laboratoire et (ou) aux conditions d'essai, de manière à ce qu'ils ne soient pas stressés
Observations et surveillance	
Généralités	- Le fournisseur doit respecter toutes les exigences relatives à la surveillance des caractéristiques de la qualité de l'eau et autres conditions de culture, telles que la température et la salinité, ainsi que le précisent les documents propres à la méthode d'essai - Le laboratoire d'essai doit établir un système interne pour évaluer la santé de chaque envoi d'organismes
Contrôle de la qualité	
Critères de santé	- Les critères de santé spécifiés dans les documents relatifs à chaque méthode doivent être respectés - Les organismes ne doivent pas servir à un essai s'ils semblent être en mauvaise santé, décolorés, ou stressés d'une manière quelconque; les larves de poisson ne doivent pas être utilisées si elles ne se nourrissent pas activement et si leur vessie natatoire n'est pas gonflée - La mortalité dans un lot donné d'organismes d'essai importés pour utilisation dans des essais de toxicité ne doit pas dépasser 10 % pour les larves de poisson et les chironomes et 20 % pour *Hyalella azteca*, dans les 24 heures qui précèdent l'essai
Essai avec produit toxique de référence	- Le laboratoire d'essai doit procéder à un tel essai pour chaque lot d'organismes d'essai importés; les procédures pour la conduite de l'essai avec un produit toxique de référence et le ou les produit(s) toxique(s) de référence utilisés doivent correspondre aux exigences stipulées dans les documents relatifs à la méthode concernée - Le laboratoire d'essai doit signaler tout essai invalide conduit avec un produit toxique de référence en parallèle avec le ou les essai(s) de toxicité de l'échantillon étudié et doit rapporter qu'il a entrepris un réexamen du système d'essai et (ou) les résultats d'un tel réexamen
Essai de contrôle de la performance	- Les organismes importés au laboratoire pour des essais doivent démontrer une performance acceptable dans les solutions de contrôle à la fin de chaque essai conduit, tel que précisé dans la documentation relative à chaque méthode d'essai

2.0 Bien-fondé

Les organismes d'essai devraient être cultivés dans le laboratoire où les essais de toxicité seront conduits (c.-à-d. à l'interne) chaque fois que cela est possible et efficace sur le plan des coûts. Cependant, s'il est impossible de maintenir des cultures à l'interne, les organismes d'essai devraient être achetés d'un établissement expérimenté dans la culture d'organismes destinés à des essais de toxicité (p. ex., fournisseurs commerciaux, laboratoires gouvernementaux ou privés, etc.).

La sensibilité des organismes pourrait varier selon la source, les antécédents génétiques, l'âge, le sexe, l'état de santé et le stress associé à tout changement récent de milieu (p. ex., transport) (EC, 1998c). Par conséquent, Environnement Canada a décidé de fournir de l'assistance sur l'utilisation d'organismes d'essai qui ne sont pas cultivés par le laboratoire chargé des essais de toxicité, mais qui proviennent d'un établissement indépendant du laboratoire d'essai et qui sont destinés à être immédiatement utilisés dans des essais de toxicité sublétale.

3.0 Organismes d'essai

3.1 Espèces et stade

Les espèces servant à caractériser la toxicité d'un échantillon dépendront de la méthode d'essai de toxicité utilisée, des exigences des autorités réglementaires et (ou) du but visé par l'essai (USEPA, 1994).

On doit connaître l'âge des organismes utilisés dans un test de toxicité donné; ils devraient tous avoir approximativement le même âge. Les organismes destinés à des essais de toxicité doivent être identifiés avec certitude à l'espèce. Le fournisseur commercial qui les fournit doit délivrer une attestation de l'identification des organismes à l'espèce, et la référence taxinomique (citation et page) ou le(les) nom(s) de l'expert ou des experts consultés. L'identification d'un spécimen représentatif doit être confirmée par un taxinomiste qualifié au moins une fois pour chaque espèce livrée par le fournisseur. Par la suite, le laboratoire d'essai peut procéder périodiquement à la confirmation de l'espèce des organismes d'essai qu'il reçoit. Pour ce faire, on compare un organisme d'un lot donné à un spécimen représentatif dont l'espèce a été confirmée auparavant par un taxinomiste, spécimen qui est gardé en dossier (c.-à-d., monté sur lames de verre ou conservé dans de l'éthanol au laboratoire d'essai).

3.2 Source

Tous les organismes utilisés dans un essai de toxicité donné doivent provenir d'une culture spécifique d'un fournisseur qui a satisfait aux critères de santé et aux exigences d'assurance de la qualité indiqués dans la méthode d'essai.

La source et la condition des organismes d'essai peut influencer la qualité des données de l'essai de toxicité. Il revient donc au laboratoire d'essai de s'assurer que les organismes proviennent de fournisseurs commerciaux, de collections de cultures, ou autres établissements expérimentés dans la culture des organismes d'essai spécifiques requis. Le fournisseur doit exercer un programme

continu d'assurance de la qualité pour fournir des organismes de haute qualité. Le programme devrait inclure des procédures de contrôle de la qualité consistant en une surveillance régulière de la santé; une évaluation de la performance des organismes qui fait appel à l'utilisation de produits toxiques de référence normalisés; des inspections par des laboratoires indépendants; et la tenue de dossiers adéquats.

Les larves de Tête-de-boule, de Capucette –*Menidia beryllina* et d'Éperlan d'eau douce – *Atherinops affinis*, ainsi que les larves ou les œufs de chironomides et les juvéniles de *Hyalella azteca*, importés pour usage immédiat dans des essais de toxicité sublétale, doivent être achetés de fournisseurs commerciaux ou de laboratoires qui maintiennent en permanence des élevages de ces organismes (EC, 1992a, 1997a et b; USEPA, 1994,1995).

3.2 Permis

Le déplacement d'animaux et de végétaux d'un endroit à l'autre soulève de sérieuses questions relativement à l'introduction d'espèces non indigènes et la propagation de maladies et de parasites. L'obtention, l'expédition et le transfert prévu d'organismes d'essais doivent être approuvés si les autorités provinciales ou fédérales l'exigent. Les gouvernements provinciaux peuvent exiger un permis pour l'importation d'organismes, que l'espèce soit ou non indigène dans la région concernée; en plus, les mouvements d'organismes aquatiques peuvent être régis par un comité fédéral-provincial des transplantations et des introductions d'espèces. Pour obtenir des conseils sur la manière d'entrer en contact avec le comité ou les autorités provinciales et les sources d'organismes d'essais, on peut communiquer avec les bureaux régionaux de la Protection de l'environnement (EC, 1992a). Par exemple, dans les régions où la Tête-de-boule n'est pas indigène (Colombie-Britannique, Île-du-Prince-Édouard, Nouvelle-Écosse, Terre-Neuve et certaines parties des autres provinces et territoires), la demande de permis doit être adressée au comité mentionné ci-dessus, à l'organisme provincial compétent, ou au directeur général régional de Pêches et Océans Canada (MPO), selon la marche à suivre localement (EC, 1992a).

Il se peut que l'on exige des laboratoires d'essai d'équiper leurs installations d'un local de mise en quarantaine afin d'isoler les gamètes ou les organismes importés et de procéder à la stérilisation et l'élimination de tout matériel et liquide (PON)mis en contact avec les organismes ou les gamètes d'essais, tel que requis par les règlements provinciaux ou fédéraux. Les organismes provinciaux ou le MPO peuvent exiger des procédures d'opération normalisées qui décrivent en détail les opérations de mise en quarantaine et les méthodes.

4.0 Élevage des organismes

4.1 Généralités

Les instructions pour l'élevage et(ou) la détention de chaque espèce d'organismes d'essais sont indiquées dans les documents se rapportant aux méthodes d'essai spécifiques de toxicité sublétale publiés par l'USEPA et dans les méthodes modifiées d'Environnement Canada. Certaines méthodes d'essai (p. ex., EC, 1992a) expliquent en détail l'élevage et (ou) la détention d'organismes destinés à des essais de toxicité (p. ex., la Tête-de-boule), alors que d'autres (p. ex.,

essais de survie et de croissance de *Hyalella azteca* et des chironomides) ne donnent que les grandes lignes et des recommandations (EC, 1997a,b); les directives précises sur plusieurs aspects de l'élevage sont dans ce cas laissées à la discrétion et l'expérience du personnel du laboratoire. Lorsque des instructions précises sur l'élevage ne sont pas fournies, on a recours aux critères établis en fonction de la performance pour évaluer si les organismes d'élevage conviennent pour les essais et la validité des résultats de l'essai (*cf.* 8.0).

Quelque soit le degré de détails fourni dans les documents propres aux méthodes d'essai, le laboratoire d'essai devrait s'assurer que le fournisseur connaît et respecte toutes les conditions exigées et recommandées pour l'élevage des organismes précisées dans les documents relatifs aux méthodes d'essais respectives. Le laboratoire d'essai doit garder en dossier les renseignements sur les méthodes d'élevage du fournisseur. Il existe différentes façon de le faire. Par exemple, le fournisseur pourrait fournir au laboratoire une procédure d'opération normalisée pour leurs méthodes d'élevage ou une confirmation signée à l'effet qu'on leur a fourni la section appropriée de la méthode concernée et qu'il s'y conforme. Le laboratoire d'essai peut aussi procéder à un audit des installations du fournisseur et recueillir toutes les informations sur l'élevage et les garder en dossier.

4.2 Installations et appareillage

Le laboratoire d'essai doit s'assurer que les installations et l'appareillage utilisés par le fournisseur pour l'élevage des organismes respectent les exigences explicites précisées dans les documents de la méthode d'essai. Tel que l'exige Environnement Canada (EC, 1997a,b), les chironomes dulcicoles et *Hyalella azteca* doivent être élevés dans des installations thermorégulées. L'équipement servant à régler la température (incubateur, bain d'eau à recirculation ou enceinte thermostatée) doit permettre de la maintenir dans les limites recommandées (c.-à-d., 23 ± 1 °C pour *Hyalella azteca* et *Chironomus riparius* ou *C. tentans*). L'aire d'élevage doit être isolée de toute activité pouvant contaminer l'élevage, et doit aussi être conçue et construite pour prévenir la contamination des élevages (p. ex., absence de conduites ou de garnitures de cuivre ou de métal galvanisé d'où pourraient dégoutter des condensats contaminés par ces métaux; utilisation d'air filtré, exempt d'huile, pour l'aération des élevages) (EC, 1997a,b). Ces conditions d'élevage sont aussi recommandées pour les bassins d'élevage des larves de poisson (c.-à-d., Tête-de-boule, Éperlan d'eau douce et Capucette) (EC, 1992a; USEPA, 1994;1995).

Tout l'équipement, tous les récipients et tous les accessoires qui risquent d'entrer en contact avec les organismes ou l'eau du local d'élevage doivent être construits en matériaux non toxiques (p. ex., verre, acier inoxydable de type 316, porcelaine, fibre de verre, Téflon^{MC}, nylon, Nalgene^{MC}, polyéthylène, polypropylène). Les matériaux toxiques (notamment le cuivre, le zinc, le laiton, les métaux galvanisés, le plomb) ainsi que le caoutchouc naturel ne doivent pas entrer en contact avec l'appareillage et l'équipement, ni avec l'eau d'élevage (EC, 1992a;1997a,b; USEPA, 1994;1995).

Les enceintes d'élevage, l'équipement de manutention et les fournitures devraient servir uniquement aux activités d'élevage. Tout matériel neuf devrait être rincé dans l'eau d'élevage avant utilisation. Après emploi, tout le matériel d'élevage devrait être nettoyé à fond et convenablement rincé. Le nettoyage peut aller du simple lavage avec un détergent à des opérations plus complexes impliquant des rinçages avec de l'acide dilué (pour éliminer les dépôts, les métaux

et les bases) et (ou) de l'acétone (pour éliminer les composés organiques), tout dépendant du degré de contamination de l'équipement. Dans tous les cas, le rinçage final doit se faire avec la même eau que celle servant à l'élevage des organismes. Pour les méthodes de nettoyage recommandées, consulter les publications de l'USEPA (1994;1995).

Les bassins de détention des organismes et l'équipement de manutention associé devraient être désinfectés entre chaque lot. Cependant, étant donné que les désinfectants sont toxiques, l'équipement devrait être rincé à fond avec de l'eau provenant de la même source que celle utilisée pour l'élevage (EC, 1991; 1992a). Il y aurait lieu d'établir des calendriers pour l'alimentation régulière des organismes et le nettoyage régulier des enceintes de détention et suivre pour cela les recommandations formulées dans les documents relatifs à la méthode d'essai concernée (EC, 1991; 1992a; 1997a,b; USEPA, 1994, 1995).

4.3 Qualité de l'eau

La qualité de l'eau utilisée pour l'élevage des organismes et de celle devant servir comme eau de dilution et de contrôle dans un essai de toxicité est extrêmement importante. L'idéal, dans les deux cas, serait qu'elle provienne de la même source (USEPA, 1994). Cependant, lorsque les organismes d'essai sont importés, cela pourrait s'avérer compliqué, voire impossible dans la plupart des cas. La plupart des documents d'Environnement Canada et de l'USEPA relatifs aux méthodes d'essai indiquent le type d'eau recommandé pour l'élevage des organismes d'essais. Le laboratoire d'essai devrait s'assurer que le fournisseur avec lequel il fait affaires respecte toutes les conditions recommandées pour l'eau d'élevage et précisées dans les documents spécifiques aux méthodes d'essai pour la détention des organismes.

Lorsque la documentation relative à la méthode d'essai ne précise pas les caractéristiques de la qualité de l'eau d'élevage ou que le fournisseur des organismes procède à des analyses peu fréquentes de la qualité de l'eau, le laboratoire d'essai doit obtenir du fournisseur l'information nécessaire (p. ex., copie des dossiers de qualité de l'eau) afin de s'assurer que la qualité de l'eau est acceptable pour permettre un taux de survie (EC, 1992a), et si applicable, une croissance et un taux de reproduction de l'espèce d'essai satisfaisants (EC, 1997a,b) (*cf.* 8.1).

L'eau servant à l'élevage d'organismes d'essai dulcicoles peut provenir d'une source souterraine ou de surface, d'eau reconstituée ou au besoin peut être de l'eau du robinet déchlorée, non contaminées. On peut également la préparer par dilution d'eau naturelle avec une eau distillée ou désionisée très pure, jusqu'à ce que l'on obtienne le degré de dureté recherché (EC, 1992a; 1997a,b).

Pour les organismes marins destinés à des essais de toxicité, l'eau d'élevage peut être de l'eau de mer naturelle ou de l'eau faite avec de la saumure hyperconcentrée préparée avec de l'eau de mer naturelle, ou encore de l'eau de mer artificielle préparée avec des produits chimiques de qualité « réactif » (GP2), ou des sels de mer artificiels vendus dans le commerce, tel que recommandé ou requis dans la documentation relative aux méthodes d'essai de toxicité respectives (USEPA, 1994;1995) et les recommandations sur l'ajustement de la salinité préparées par Environnement Canada (EC, 1997c).

L'eau déchlorée est déconseillée pour l'élevage et (ou) comme eau d'essai, vu sa qualité souvent variable et qu'elle pourrait renfermer des concentrations inacceptables de chlore, de chloramines, de fluorures, de cuivre, de plomb, de zinc ou autres contaminants (EC, 1997a,b). En particulier, on ne devrait pas utiliser d'eau déchlorée du réseau d'alimentation municipal pour l'éclosion d'embryons de poissons ou l'élevage des larves, car il est difficile d'éliminer les dernières traces de chlore résiduel et de substances organochlorées éventuellement toxiques pour le stade larvaire (EC, 1992a). De l'eau déchlorée peut par contre être utilisée si l'eau potable du réseau municipal est efficacement déchlorée pour éliminer toute concentration nocive de chlore ou de chloramines résiduels (CRT) (c.-à-d., teneur d'au plus 0,002 mg/L, tel que recommandé par le Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement - CCME, 1987 - pour la protection des organismes dulcicoles et (ou) d'au plus 0,01 mg/L, tel que recommandé par l'USEPA – 1994;1995 – pour la protection des organismes marins) et que l'on a auparavant fait la preuve que cette eau permettait une performance acceptable des organismes.

Lorsque de l'eau reconstituée est utilisée pour l'élevage d'organismes d'essai, elle devrait être préparée selon le mode de préparation indiqué dans la documentation relative à la méthode d'essai concernée. Si l'eau reconstituée doit servir d'eau de dilution et d'eau de contrôle pour l'essai de survie et de croissance de la Tête-de-boule, il faut dans ce cas acclimater les Tête-de-boule reproductrices à l'eau reconstituée ou à une eau du même genre, pendant au moins cinq jours précédant immédiatement le prélèvement des embryons pour l'essai. On entend par eau du même genre : (a) une eau naturelle d'une dureté comprise à l'intérieur de 20 % de celle de l'eau reconstituée; (b) une eau naturelle de plus grande dureté ajustée à la baisse à la dureté recherchée avec de l'eau désionisée; ou (c) une eau naturelle alcaline dont la dureté est ajustée à la hausse avec les quantités et le ratio appropriés de sels de qualité « réactif ». Si les organismes reproducteurs ne sont pas acclimatés de la sorte, l'avantage d'une eau de dilution normalisée pourrait être perdu.

Si on utilise de l'eau de surface pour l'élevage, on devrait la passer dans un tamis fin (c.-à-d., à mailles de 60 µm) pour en éliminer les prédateurs ou les organismes rivaux potentiels. On peut stériliser l'eau qui pourrait être contaminée par des pathogènes en la faisant traverser un stérilisateur aux ultraviolets (EC, 1992a; USEPA, 1994;1995).

Les caractéristiques de l'eau varient considérablement d'une installation à l'autre. Ces variations peuvent influencer fortement la santé des organismes et les résultats de l'essai. De plus, la qualité de l'eau d'alimentation à l'intérieur d'une installation peut aussi changer périodiquement (EC, 1998c). Il faudrait procéder à des contrôles réguliers des variables chimiques et à l'évaluation de l'eau d'élevage chez le fournisseur pour démontrer que l'eau a conservé une qualité acceptable. On devrait procéder régulièrement à un contrôle des variables de l'eau d'élevage telles que le pH, le carbone organique total, les matières solides en suspension, l'oxygène dissous, le total des gaz dissous, la température, l'azote ammoniacal, les nitrites, les métaux, les pesticides ainsi que le chlore résiduel (si l'eau provient du réseau municipal); la dureté, l'alcalinité et la conductivité (si de l'eau douce est utilisée); et la salinité (si on utilise de l'eau de mer). Des analyses devraient être effectuées aussi souvent que nécessaire pour documenter la qualité de l'eau (p. ex., trimestriellement) et (ou) lorsqu'on éprouve de la difficulté à respecter les critères minimums d'acceptabilité pour la santé des organismes d'essai et (ou) le contrôle de la performance (EC, 1992a; 1997a,b; USEPA, 1994;1995). Certains paramètres tels que la température, l'oxygène dissous, le pH et la salinité devraient être vérifiés plus fréquemment (de préférence tous les jours).

La limite de détection de chaque méthode devrait être largement inférieure (p. ex., 3 à 10 fois) soit à la concentration dans l'eau, soit à la plus faible concentration qui s'est révélée nocive pour la survie, la croissance ou le développement de l'espèce soumise à l'essai ou de tout autre organisme dulcicole sensible (EC, 1992e).

Des dossiers détaillés des analyses de la qualité de l'eau du fournisseur devraient être tenus à des fins de comparaison des critères relatifs aux teneurs maximales admissibles en contaminants établis par le laboratoire d'essai ou le fournisseur (EC, 1998c; USEPA, 1994). Les critères de qualité de l'eau d'élevage établis par le fournisseur et (ou) le laboratoire d'essai doivent se baser sur tout critère existant spécifié dans la documentation pertinente à chacune des méthodes d'essai (EC, 1991). Le traitement de l'eau par filtration sur charbon activé, filtration des particules, irradiation aux ultraviolets, échange d'ions ou filtration par osmose inverse pourrait s'avérer nécessaire pour respecter les critères de l'eau d'élevage établis par le laboratoire d'essai ou le fournisseur. Les traitements appliqués à l'eau et leur raison d'être devraient toujours être indiqués par le fournisseur (p. ex., dans une procédure d'opération normalisée) (EC, 1992a; 1997a,b; USEPA, 1994; 1995).

L'eau des enceintes doit être renouvelée régulièrement. Le renouvellement peut être effectué manuellement ou automatiquement à l'aide d'appareils et de techniques convenables pour le renouvellement continu ou périodique (EC, 1992a; 1997a,b: USEPA, 1995).

4.4 Qualité de l'alimentation

La qualité nutritive des aliments utilisés pour l'élevage des poissons et des invertébrés soumis à l'essai de toxicité est un facteur important pour la qualité des données de l'essai. Une alimentation non conforme influence la survie, la croissance et la reproduction des organismes d'essai dans les élevages et les essais de toxicité. Par exemple, la teneur irrégulière en acides gras des larves nauplius d'*Artémia* utilisées pour nourrir les nouveau-nés de Tête-de-boule, de Capucette et d'Éperlan d'eau douce (EC, 1992a; USEPA, 1994;1995) ont conduit l'USEPA (1994;1995) à exiger que chaque nouveau lot de kystes d'*Artémia* soit évalué pour la taille et leur valeur nutritive par rapport à des kystes de référence que l'on sait convenables, en exécutant un essai parallèle de croissance des larves avec le « nouveau » kyste et le kyste « de référence ».

Pour l'élevage des invertébrés (Chironomes et Amphipodes), le choix et la quantité des aliments commerciaux pour poisson à ajouter à chaque enceinte d'élevage et la fréquence d'alimentation sont laissés à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire, bien que les méthodes d'Environnement Canada fournissent certaines directives sur l'alimentation des élevages d'invertébrés (EC, 1997a,b).

Si l'on a des doutes sur la qualité d'un lot d'aliments quelconque destiné au maintien des élevages d'organismes d'essai (poissons ou invertébrés), on devrait procéder à des essais en parallèle pour évaluer la performance des organismes nourris avec ce lot d'aliments à la performance d'organismes recevant des aliments de qualité connue. Des essais sublétaux de courte durée devraient être conduits dans le but de déterminer si la qualité des aliments affecte la croissance ou la reproduction des différentes espèces d'essai en élevage, en utilisant quatre répétitions pour chaque source de nourriture (USEPA, 1994;1995). Les fournisseurs qui maintiennent des élevages

d'organismes d'essai devraient s'assurer que la valeur nutritive de l'alimentation permet une survie, une croissance et une reproduction acceptables des organismes.

La valeur nutritive des aliments utilisés pour l'élevage d'organismes d'essai peut être retracée en tenant à jour des dossiers sur la provenance des aliments et les résultats obtenus pour l'élevage des organismes, et par des échanges d'information sur toute valeur nutritive mesurée avec d'autres installations d'élevage ou laboratoires (EC, 1992a).

Il est de plus souhaitable d'évaluer la teneur en contaminants toxiques de la nourriture donnée aux poissons et invertébrés, en particulier s'il s'agit d'aliments en flocons et d'œufs *d'Artémia*. Les métaux bio-accumulables et les pesticides sont particulièrement préoccupants. Les nouveaux lots d'aliments utilisés pour les élevages devraient être analysés pour leur teneur en substances organiques et métaux toxiques ou lorsqu'on éprouve de la difficulté à respecter les critères minimums admissibles pour le contrôle de la survie et la croissance (USEPA, 1994). D'autres laboratoires ayant l'expérience en la matière peuvent souvent fournir des avis sur les aliments qui sont acceptables ou non en fonction de leurs observations.

Les arrivages d'aliments devraient être contrôlés sur une base régulière pour examiner s'ils contiennent des contaminants en traces, et des dossiers devraient être tenus pour pouvoir comparer les critères de valeur nutritive minimum et de teneur maximale admissible en contaminants (EC, 1998c). Les critères précisés dans la documentation relative aux méthodes d'essai (p. ex., USEPA, 1994) devraient être utilisés pour établir les critères du laboratoire.

Si des aliments autres que ceux recommandés sont utilisés pour maintenir des organismes d'essai, il faut les évaluer. Des essais de toxicité en parallèle avec la nourriture conseillée et la nourriture de substitution devraient être conduits. Les résultats de ces essais devraient respecter les exigences pour que l'essai soit considéré valide et devraient se situer dans les limites de contrôle du produit toxique de référence pour chaque espèce (*cf.* 8), pour que la nourriture de substitution soit considérée convenable pour l'élevage (USEPA, 1994; 1995).

4.4 Morbidité, mortalité et traitement

Avant leur expédition à un laboratoire d'essai, l'état de santé des organismes destinés à des essais de toxicité sublétale doit être vérifié. Les organismes doivent être en bonne santé, n'être porteurs d'aucune maladie et démontrer une mortalité minimum dans les enceintes d'élevage dans la période de temps précédant l'essai (c.-à-d., la période précisée dans les documents de l'USEPA et d'Environnement Canada relatifs aux méthodes spécifiques). Les organismes d'essai doivent être examinés minutieusement par le fournisseur avant l'expédition, et par le laboratoire d'essai avant leur utilisation dans un essai de toxicité, et cela pendant une période de temps considérée raisonnable pour l'espèce, afin de s'assurer qu'ils ne sont porteurs d'aucune maladie, qu'ils se comportent normalement et sont en bon état physique (USEPA, 1994;1995). Tout organisme ou lot d'organismes dont l'état de santé est mis en doute ne doivent pas être utilisés dans des essais de toxicité sublétale.

On devrait éviter autant que possible de traiter des organismes d'essai avec des produits chimiques pour prévenir ou enrayer une maladie. Si l'on a d'autre choix que d'utiliser un stock de géniteurs qui ont été traités avec des produits chimiques, la période d'attente après le traitement (tel que

recommandée ou spécifiée dans la documentation relative aux méthodes respectives) doit être observée avant que leur progéniture puisse être utilisée dans des essais (EC, 1992a).

La plupart des laboratoire sacrifient immédiatement les animaux malades. Tout organisme d'essai qui s'est rétabli d'une maladie ou qui a déjà été exposé à un essai ne peut être utilisé dans un autre essai (EC, 1991).

5.0 Transport et manutention

Les renseignement nécessaires à l'identification appropriée des organismes d'essai transportés à un laboratoire d'essai doivent être fournis avec chaque envoi. Les dossiers joints à chaque lot d'organismes d'essai doivent indiquer, au minimum, le nombre et la provenance des organismes pour chaque envoi, le nom du fournisseur, l'âge des organismes d'essai (c.-à-d., la date et l'heure d'éclosion), la date d'arrivée au laboratoire, leur état à l'arrivée, et l'identification de l'espèce. Il faudrait également joindre les données sur la qualité de l'eau et les conditions d'élevage.

Le transport d'organismes importés pour utilisation immédiate dans des essais de toxicité sublétale doit s'effectuer de manière à maintenir en cours de transport toutes les caractéristiques de l'eau et(ou) des sédiments dans lesquels les organismes sont expédiés.

Pour assurer que l'état de santé des organismes d'essai ne sera pas affecté durant le transit, les organismes doivent être transportés au laboratoire aux conditions de température, d'oxygène dissous, et lorsque applicable, de salinité précisées dans la documentation relative à la méthode d'essai concernée. Pour les organismes qui seront utilisés dans les 24 à 48 heures après leur arrivée aux installations d'essai, la température de l'eau et (ou)des sédiments (et si applicable, la salinité) dans lesquels les organismes sont transportés doit être maintenue à ou aux environs des conditions d'essai, vu qu'on ne dispose que de peu de temps, voire pas de temps du tout pour l'acclimatation à leur arrivée au laboratoire d'essai (*cf.* 6.0). Durant le transport, la température des organismes d'essai ne doit pas varier de plus de 3 °C au cours d'une période de 24 h[1]. Les contenants d'expédition devraient être isolés pour minimiser les variations de la température de l'eau en cours d'acheminement. Selon les conditions et l'heure à laquelle le transport est effectué, il pourrait s'avérer nécessaire de refroidir ou de réchauffer le contenu du ou des contenant(s) de transport en cours d'acheminement (EC, 1992a). Dans le cas où les organismes d'essai ne peuvent être livrés le jour même de l'envoi, les contenants utilisés pour leur transport doivent être entreposés de manière à maintenir la température des organismes. La température des organismes d'essai doit être enregistrée au départ des installations du fournisseur et à leur arrivée au laboratoire d'essai.

L'eau utilisée pour transporter des organismes d'essai doit être bien oxygénée (p. ex., 90 à 100 % de la valeur de saturation) avant l'envoi (EC, 1997a,b). Au cours du transport, la teneur en oxygène dissous doit être maintenue au taux minimum ou à un taux supérieur à celui indiqué pour l'élevage des organismes dans la documentation relative à la méthode d'essai (p. ex., >4,0 mg/L pour la Capucette; > 6,0 mg/L pour l'Éperlan d'eau douce – *Atherinops affinis*; >80 % de

[1] Si le transport s'effectue de nuit, des thermomètres enregistreurs peuvent être utilisés pour surveiller la température des organismes transportés. Le système BOXCAR est un enregistreur de température programmable par ordinateur qui fournit un profil de la température de l'envoi.

saturation pour *Hyalella azteca*, les Chironomes et la Tête-de-boule). Le taux recherché d'oxygène dissous peut être maintenu en remplaçant l'air dans les sacs placés au-dessus de l'eau par de l'oxygène d'une bouteille à gaz comprimé et en scellant les sacs. Une autre méthode couramment employée pour maintenir la teneur en oxygène dissous lors de transport sur de courtes distances consiste à aérer avec une pierre à air fournie avec une pompe portative (USEPA, 1994).

Il existe d'innombrables façons de transporter les organismes provenant d'un fournisseur commercial (p. ex., sacs de plastique ou flacons de plastique de 500 mL à large ouverture et à capsule à vis, glacières). Les organismes devraient être transportés au laboratoire dans de l'eau provenant de la même source que celle ayant servi à leur élevage. Lorsque cela s'applique (c.-à-d., pour les invertébrés), un substrat convenable devrait être fourni (EC, 1997a,b). Il faut éviter une trop forte densité d'animaux dans les contenants de transport afin de les stresser le moins possible (c.-à-d. que les organismes ne doivent pas paraître stressés) et prévenir un manque d'oxygène (c.-à-d. que la teneur en oxygène doit être équivalente ou supérieure au taux minimum requis pour l'élevage des organismes, voir paragraphe précédent)[2]. Pour de plus amples renseignements sur le transport et la manutention d'organismes d'essai, les laboratoires devraient consulter des fournisseurs d'organismes reconnus.

Certains documents relatifs à des méthodes d'essais sublétaux (p. ex., les essais de croissance et de survie pendant 7 jours des larves d'Éperlan d'eau douce – *Atherinops affinis* – et de Capucette – *Menidia beryllina* de l'USEPA) donnent des directives détaillées sur l'importation d'organismes d'essai pour utilisation immédiate dans des essais de toxicité[3]. Dans ces cas, toutes les conditions de manutention et de transport doivent être respectées, et s'il en est, les recommandations devraient être suivies.

On devrait manipuler le moins possible les organismes. Si leur manipulation ne peut être évitée, il faut procéder avec toute la délicatesse, le soin et la rapidité possibles pour les stresser au minimum (USEPA, 1994; 1995). Les organismes que l'on a laissé tomber ou qui touchent à des surfaces sèches ou qui sont blessés lors de la manipulation doivent être rejetés (EC, 1997a,b; USEPA, 1994; 1995).

6.0 Acclimatation et détention

Afin de s'assurer que la qualité des organismes d'essai importés soit maintenue à leur arrivée au laboratoire d'essai, les conditions de détention, de manutention et de soins des organismes

---

[2] Pour l'envoi de *Hyalella azteca* âgées de 1 à 8 jours à un laboratoire d'essai, le nombre d'organismes devrait être inférieur à 500 par litre d'eau contenue dans le récipient de transport. De plus, ils ne devraient pas rester dans des contenants de transport fermés pour > 24 h.

[3] Les larves de Capucette *Menidia beryllina* sont très sensibles à la manutention et au transport durant la première semaine suivant l'éclosion. Pour cette raison, si de tels organismes doivent être envoyés à un laboratoire d'essai, il serait préférable de prendre des larves d'au moins 11 jours, vu que la sensibilité d'organismes plus jeunes pourrait entraîner une forte mortalité en cours d'envoi. Les organismes destinés à un laboratoire d'essai devraient être envoyés (1) au stade embryonnaire de manière à ce qu'ils éclosent après leur arrivée, ou (2) après avoir acquis la certitude qu'ils se nourrissent convenablement de larves nauplius d'*Artémia* (8 à 10 jours d'âge). Les larves âgées de 8 à 10 jours lors de l'envoi auraient entre 9 et 11 jours lorsque l'essai est mis en route. Les larves qui ont éclos et qui ont été élevées au laboratoire d'essai peuvent être utilisées lorsqu'elles ont 7 jours (USEPA, 1994).

devraient être établies et maintenues dans les installations d'essai. Lorsque les méthodes d'essai le précisent, les conditions d'élevage et de détention doivent être les mêmes que les conditions d'essai en ce qui a trait aux paramètres tels que la température, l'éclairage et la photopériode.

Les organismes destinés à des essais dans les premières 24 à 48 h après leur arrivée au laboratoire d'essai devraient, dans la mesure du possible, être élevés par le fournisseur dans de l'eau ayant les mêmes qualités (p. ex., température, pH, alcalinité dureté, salinité) que l'eau de contrôle/de dilution du laboratoire.

Les Tête-de-boule importées pour des essais de toxicité sublétale ne devraient pas subir des écarts de température de plus de 3 °C par jour. Pour l'Éperlan d'eau douce – *Atherinops affinis*, la Capucette *Menidia beryllina*, *Hyalella azteca* et les Chironomes, les écarts de température ne devraient pas être supérieurs à 2 °C par jour. En ce qui concerne la salinité, les variations pour l'Éperlan d'eau douce et la Capucette ne devraient pas excéder 3 g/kg par période de 12 h (EC, 1992a; 1997a,b; USEPA, 1994; 1995). Si les méthodes d'essai le précisent, les périodes et le rythme d'acclimatation doivent être respectés.

À l'arrivée au laboratoire, les organismes doivent être acclimatés aux conditions de détention du laboratoire aussi graduellement que possible de manière à ce que le stress causé par l'acclimatation n'influence pas les résultats de l'essai. Les organismes devraient être gardés dans l'eau et les sédiments dans lesquels ils ont été transportés alors que la température est ajustée. Une autre manière consiste à les transférer dans de l'eau bien oxygénée, aux caractéristiques identiques à l'eau dans laquelle ils ont été élevés, et dont la température correspond à celle de l'eau dans laquelle ils ont été transportés. Dans tous les cas, il est recommandé d'exposer graduellement les organismes à l'eau d'élevage du laboratoire d'essai, en particulier lorsque la qualité de l'eau (p. ex., dureté, pH, conductivité) diffère considérablement de celle à laquelle ils étaient précédemment acclimatés. Cela devrait minimiser le stress dû à une eau dont les caractéristiques de qualité ne sont pas identiques. Une façon utile de procéder à l'acclimatation d'organismes d'essai consiste à les détenir pendant 2 h dans un mélange constitué moitié d'eau d'élevage et moitié d'eau d'essai (50 : 50), puis pour 2 h dans un mélange fait de 25 parties d'eau d'élevage et 75 parties d'eau d'essai, et terminer par une autre période de 2 h dans de l'eau constituée à 100 % d'eau d'essai avant leur introduction dans les enceintes d'essai (Ingersoll et Nelson, 1990). On peut aussi siphonner toutes les 2 à 3 h entre 20 et 30 % de l'eau dans laquelle ils ont été transportés et la remplacer par de l'eau de contrôle/de dilution du laboratoire, en veillant à ce que la température demeure constante pendant la période d'acclimatation. L'acclimatation devrait commencer dès l'arrivée des organismes au laboratoire d'essai. Idéalement, les organismes d'essai (autres que les larves de Tête-de-boule) devraient être détenus dans l'eau de contrôle/de dilution du laboratoire pendant deux jours avant la mise en route de l'essai.

7.0 Observations et surveillance

Tel que mentionné à la section 4.3, la qualité de l'eau dans les enceintes d'élevage devrait être régulièrement surveillée et inscrite dans les dossiers par le fournisseur des organismes. Le fournisseur doit respecter toutes les exigences précisées dans les méthodes d'essai pour la surveillance des caractéristiques de l'eau et autres conditions d'élevage (p. ex., température, salinité). Le fournisseur devrait également suivre les recommandations relatives à l'observation et la surveillance des élevages formulées dans la documentation des méthodes d'essai respectives. À

l'instar de la qualité de l'eau (*cf.* 4.3), les critères d'admissibilité pour les conditions environnementales comme la température, l'éclairage, le rythme de renouvellement de l'eau et les densités dans les enceintes de détention devraient être établis en fonction des conditions précisées dans la documentation propre aux méthodes d'essai, et le fournisseur des organismes d'essai devrait s'assurer régulièrement qu'ils sont respectés.

Le laboratoire d'essai doit concevoir une pratique interne pour évaluer l'état de santé de chaque arrivage d'organismes (p. ex., une PON). Les organismes doivent être observés minutieusement chaque jour pour détecter tout signe de maladie, de contamination par d'autres organismes, de stress, de blessures ou de mortalité. Les organismes morts ou anormaux devraient être immédiatement enlevés. Il n'est pas rare d'observer, pendant les premières 48 heures dans les enceintes de détention, une certaine mortalité (de 5 à 10 %) parmi les organismes importés causée par le refus d'individus de se nourrir (USEPA, 1994). Il serait donc préférable d'entreprendre la surveillance du taux de mortalité préalable à l'essai 24 heures après l'arrivée des organismes à l'installation d'essai (*cf.* 4.5 et 8.1).

8.0 Contrôle de la qualité

Pour qu'un essai soit valide, les critères de performance doivent être respectés. Ces critères comprennent : (a) ceux liés à la survie et aux conditions des organismes d'élevage destinés à l'essai (p. ex., critères de santé des organismes); (b) la performance des groupes d'organismes dans les essais de toxicité avec un produit de référence et (c) les critères applicables aux organismes de contrôle durant un essai (c.-à-d., contrôle de la performance au cours de l'essai). Ces critères de performance sont fréquemment utilisés pour évaluer si les organismes d'élevage conviennent pour les essais et pour l'acceptation des résultats d'essai, en particulier lorsque la documentation pertinente à une méthode d'essai ne décrit pas en détail les exigences pour l'élevage des organismes (EC, 1997a,b).

Pour que les organismes puissent être utilisés dans des essais, la mortalité dans les élevages du fournisseur/ou du laboratoire doit être faible, et les organismes d'élevage doivent paraître en bonne santé, avoir un comportement normal et s'alimenter normalement, être d'âge et de taille appropriés avant l'envoi à un laboratoire et avant la mise en route d'un essai. Les essais utilisant des méthodes de distribution au hasard ainsi que les normes de contrôle de la qualité requises et suggérées comportent plusieurs contrôles automatiques de la réponse typique des organismes. Un indicateur couramment utilisé pour établir la santé des organismes comprend des critères de conformité spécifiques à l'essai. La conformité de l'élevage devrait également être démontrée en conduisant des essais parallèles ou continus avec un ou plusieurs produits toxiques de référence.

8.1 Critères de santé des organismes d'essai

Les indicateurs subjectifs et objectifs de la santé des organismes sont disponibles dans les documents pertinents aux méthodes d'essai (USEPA, 1990). Il faut respecter les critères de santé des organismes d'essai précisés dans la documentation applicable à une méthode d'essai donnée. Les indicateurs pour déterminer l'état de santé des organismes comprennent : une activité et un comportement normaux; une alimentation active et une bonne coloration. Un groupe d'organismes qui ne semble pas en bonne santé, qui sont décolorés ou stressés d'une manière quelconque ne doit

par être utilisé pour un essai. Les larves de poisson ne doivent pas être utilisées si elles ne se nourrissent pas activement et si leur vessie natatoire n'est pas gonflée. La mortalité dans un lot donné d'organismes importés pour être soumis à des essais immédiats de toxicité sublétale ne doit pas excéder 10 % pour les larves de poissons et les chironomes dulcicoles et 20 % pour *Hyalella azteca* dans les 24 heures qui précèdent immédiatement l'essai. Si un lot d'organismes ne rencontre pas ces critères, on devrait les détruire de façon humanitaire et obtenir un nouveau lot (OCDE, 1992; EC, 1997a,b; USEPA, 1994; 1995). Les organismes doivent être traités avec attention et si cela s'avère nécessaire, détruits de manière humanitaire selon les lignes directrices établies par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA, 1984; 1993).

8.2 Essais avec produit (s) toxique(s) de référence

En plus des critères de santé établis pour les organismes d'essai, leur état de santé doit être documenté en exécutant régulièrement des essais avec un ou des produits toxiques de référence (USEPA, 1990). L'utilisation systématique d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence est nécessaire pour évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative de l'élevage ou des élevages d'organismes, ainsi que la précision et la fiabilité des données obtenues par le laboratoire (EC, 1992a; 1997a,b). Il incombe au personnel du laboratoire d'essai de démontrer la sensibilité relative des lots individuels d'organismes utilisés dans un essai de toxicité donné, et de montrer qu'il est capable d'obtenir des résultats cohérents et précis avec le ou les produits toxiques de référence.

Il faut s'assurer de la qualité des organismes obtenus de sources extérieures en conduisant des essais avec un ou des produits toxiques de référence. Lorsqu'un laboratoire importe des organismes pour utilisation immédiate dans des essais de toxicité sublétale, la sensibilité de chaque lot d'organismes d'essai doit être déterminée par un essai avec un produit toxique de référence[4]. Les méthodes d'essai avec un ou des produits toxiques de référence ainsi que le ou les produits à utiliser doivent correspondre aux exigences stipulées dans la documentation relative à une méthode d'essai spécifique. L'essai avec un produit toxique de référence est particulièrement utile lorsqu'il est conduit en parallèle avec l'essai de toxicité proprement dit. Par conséquent, lorsque des essais de toxicité sont conduits avec des effluents, des eaux réceptrices, des produits chimiques ou des sédiments auxquels sont exposés des organismes qui n'ont pas été élevés au laboratoire d'essai, des essais du même genre avec le ou les produits toxiques de référence devraient être conduits simultanément (exceptés pour les essais toxicologiques avec sédiments qui consistent en des essais de 96 h dans l'eau seulement).

Un fournisseur d'organismes qui maintient un élevage des organismes d'essai devrait fournir un diagramme de contrôle comportant les données des essais de toxicité sublétale des cinq derniers mois au moins avec le même produit toxique de référence ainsi qu'un sommaire des conditions d'essai utilisées pour les essais avec le produit toxique de référence.

---

[4] Dans le cas d'organismes obtenus de sources extérieures, la fréquence des essais avec un produit de référence n'est pas la même que celle stipulée dans les méthodes d'essai pour les organismes élevés à l'interne, soit une fois par mois, étant donné que les conditions d'élevage chez un fournisseur commercial ne sont pas nécessairement contrôlées/surveillées avec autant de rigueur que s'il s'agit d'élevages internes (c.-à-d., au laboratoire d'essai). De plus, les conditions de transport et de manutention des organismes d'essai ne sont jamais les mêmes lorsqu'ils sont acheminés au laboratoire d'essai, ce qui entraîne une variabilité inconnue d'un lot à l'autre d'organismes d'essai reçus par le laboratoire d'essai.

Si un essai de routine avec un produit de référence toxique conduit par le laboratoire d'essai ne rencontre pas les critères d'acceptabilité (p. ex., survie, croissance et reproduction des organismes de contrôle), ou ne se situe pas dans les limites du diagramme de contrôle, le laboratoire devrait rechercher pour quelle raison les résultats de l'essai sont à l'extérieur des limites de contrôle (EC, 1990c). Il y aurait lieu, en plus ,de revoir le système d'essai, c'est-à-dire toutes les conditions et tous les modes opératoires de l'essai et, si possible, de conduire un autre essai avec le produit toxique de référence. L'étude conduite par le laboratoire doit aussi vérifier, au minimum, la qualité des données du fournisseur des organismes; la méthodologie et les conditions utilisées pour l'élevage des organismes ainsi que les conditions d'acheminement au laboratoire d'essai. Si l'essai avec le produit toxique de référence qui a échoué a été conduit en parallèle avec les essais sur un effluent, de l'eau réceptrice, un produit chimique ou des sédiments, le laboratoire d'essai doit signaler l'essai avec le produit toxicologique de référence qui a échoué, les résultats d'un nouvel essai (si conduit), et les conclusions de l'étude conduite.

8.3 Performance de l'essai de contrôle

Les organismes destinés à des essais et importés par le laboratoire doivent aussi démontrer une performance « acceptable » dans les solutions de contrôle, à la fin de chaque essai conduit. Les critères d'acceptabilité pour les solutions de contrôle sont mentionnés dans la documentation propre à chaque méthode d'essai. Les critères de performance dans les solutions de contrôle pourraient comprendre le taux maximum de mortalité et de comportement anormal des organismes d'essai et les taux minimums pour les variables de mesures sublétales telles que la croissance, la reproduction et la fécondation.

Si les organismes d'essai ont été élevés dans de l'eau différente de l'eau de contrôle/de dilution, la plupart des méthodes d'essai (p. ex., essai de survie et croissance de la Tête-de-boule sur 7 jours d'Environnement Canada) exigent d'inclure une seconde série de solutions de contrôle utilisant l'eau d'élevage (EC, 1992a).

9.0 Rapports et tenue des dossiers

Les renseignements particuliers sur les organismes d'essai utilisés dans un essai de toxicité sublétale donné doivent être obtenus du fournisseur des organismes conformément aux sections relatives aux exigences figurant dans les documents propres aux méthodes de l'USEPA et les méthodes modifiées d'Environnement Canada. Le chapitre traitant des rapports à produire dans les documents relatifs aux méthodes d'essai biologique publiées par Environnement Canada comportent deux types de renseignements sur les organismes d'essai. La première liste qui figure sous « Exigences minimales d'un rapport d'essai » contient les points relatifs aux organismes d'essai qui doivent figurer dans chaque procès-verbal d'un essai et qui doivent par conséquent être obtenus du fournisseur des organismes pour chaque lot d'organismes d'essai. Les renseignements relatifs aux organismes d'essai figurant sous « Exigences supplémentaires » doivent également être obtenus du fournisseur des organismes pour être versés dans le procès-verbal de l'essai ou aux dossiers du laboratoire d'essai. Pour les méthodes de l'USEPA, Environnement Canada a publié un document énumérant les renseignements spécifiques aux organismes d'essai qui sont exigés dans chaque procès-verbal sous « Programme de suivi des effets sur l'environnement pour l'industrie des pâtes et papiers et l'industrie minière (EC, 1998d,e).

9.1 Exigences minimales d'un rapport d'essai

En plus des informations exigées dans la section « Exigences minimales d'un rapport d'essai » énumérées dans les documents propres à une méthode donnée, les renseignements suivants doivent être fournis par le fournisseur des organismes d'essai et (ou) obtenus du laboratoire d'essai pour chaque lot d'organismes d'essai reçu par le laboratoire d'essai.

9.1.1 Organismes utilisés

- Nom et adresse du fournisseur des organismes;
- Âge des organismes (c.-à-d., date et heure de l'éclosion).

9.1.2 Élevage

- Tout écart des exigences propres à une méthode d'essai indiquées par « doit », «doivent » ou « il faut » pour l'élevage des organismes d'essai; installations et appareillage utilisés pour l'élevage des organismes; et conditions de l'eau d'élevage/de détention;
- Tout aspect ou comportement inhabituels et taux de mortalité des géniteurs et des organismes d'essai observés par le fournisseur; toute maladie observée.

9.1.3 Transport et manutention

- Température, oxygène dissous et salinité (si applicable) de l'eau et (ou) des sédiments servant au transport des organismes, avant leur envoi et à leur arrivée au laboratoire d'essai;
- Tout aspect ou comportement inhabituels des organismes à leur arrivée au laboratoire d'essai.

9.1.4 Acclimatation

- Brève description du rythme d'acclimatation des organismes d'essai et de la méthode d'acclimatation (utilisée au laboratoire d'essai).

9.1.5 Contrôle de la qualité

- Données à l'effet que les critères de santé des organismes d'essai sont respectés;
- Tout aspect ou comportement inhabituels des organismes dans la période qui précède immédiatement un essai de toxicité (consigner la période où les observations ont été faites par rapport au début de l'essai); pour les larves de poissons, courte indication à l'effet que leur vessie natatoire était gonflée et qu'elles se nourrissaient convenablement;

- Données montrant le taux de mortalité des organismes à leur arrivée au laboratoire d'essai ainsi qu'au cours de la période (p. ex., 24 heures) précédant immédiatement un essai de toxicité;
- Les résultats et la durée de l'essai avec un ou des produit(s) toxique(s) de référence pour chaque lot d'organismes d'essai utilisé dans un essai de toxicité sublétale, ainsi que la moyenne géométrique (± 2 écart types) pour le ou les mêmes produit(s) toxique(s) de référence obtenus par le laboratoire d'essai lors d'essais antérieurs.

9.2 Exigences supplémentaires

En plus des renseignements exigés sous « Exigences supplémentaires » des documents se rapportant à une méthode donnée, les points suivants doivent être obtenus du fournisseur des organismes et (ou) gardés en dossiers par le laboratoire d'essai pendant cinq ans.

9.2.1 Organismes d'essai

- Confirmation de l'identification de l'espèce; référence taxinomique (publication et page) ou nom(s) du spécialiste en taxinomie consulté pour l'identification des organismes d'essai;
- Tout certificat relatif à la santé des organismes;
- Origine des reproducteurs pour les organismes d'essai élevés en laboratoire;
- Description détaillée des soins en matière de santé et des traitements appliqués en cas de maladie;
- Permis des autorités provinciales ou régionales pour l'obtention, l'envoi et le transfert d'organismes d'essai, lorsque requis.

9.2.2 Élevage

- Description détaillée des installations d'élevage chez le fournisseur et des méthodes d'élevage utilisées;
- Critères d'acceptation pour l'alimentation des organismes, la qualité de l'eau et autres conditions du milieu telles que température, pH, éclairage, oxygène dissous, rythme du changement de l'eau et densités dans les enceintes de détention;
- Résultats de l'évaluation de la nourriture si autre que celle recommandée dans les documents propres à une méthode d'essai ou si la nourriture diffère d'aliment(s) précédemment évalué(s) et considéré(s) acceptable(s);
- Résultats des analyses chimiques conduites sur l'eau d'élevage/de détention, la nourriture des organismes et autres conditions du milieu;
- Tout reproducteur ou organisme d'essai traités ou exposés à des produits chimiques (c.-à-d., à des fins de traitement ou de prévention de maladie).

9.2.3 ***Transport et manutention***

- Nombre d'organismes, taille, et volume d'eau et (ou) de sédiments par récipient d'envoi.

9.2.4 ***Acclimatation***

Détails sur le rythme d'acclimatation et les méthodes utilisées, y compris les conditions de détention chez le fournisseur des organismes, les conditions dans lesquelles les organismes ont été acclimatés au laboratoire d'essai ainsi que le rythme et la méthode d'acclimatation utilisée par celui-ci.

9.2.5 ***Observations et surveillance***

- Nature et moment de toute surveillance exercée
- Dossiers exigés pour la surveillance des élevages d'organismes (p. ex., caractéristiques de la qualité de l'eau, température, salinité);
- Description du protocole utilisé par le laboratoire pour évaluer l'état de santé de chaque envoi d'organismes d'essai.

9.2.6 ***Contrôle de la qualité***

- Une copie du diagramme de contrôle du toxique de référence du fournisseur pour les organismes d'essai maintenus en élevage; un résumé des conditions d'essai utilisées dans l'essai de référence.

10.0 Remerciements

Cette procédure a été rédigée par J.A. Miller (Miller Environmental Sciences Inc., Stroud, Ont.). L'autorité scientifique, Richard O. Scroggins (Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Gloucester, Ont.), a fourni tout au long du travail un apport et une orientation scientifiques. Les personnes suivantes qui ont revu le document avant publication ont apporté des observations et des conseils à la fois nombreux et utiles et méritent tous nos remerciements : M^{me} A. Borgmann (Protection de l'environnement, région de l'Ontario, EC, Toronto, Ont.) pour ses conseils sur le transport et la manutention d'invertébrés; J. Bruno (Centre des sciences en environnement du Pacifique, région du Pacifique et du Yukon, EC- North Vancouver, C.-B.); K. Doe (Conservation de l'environnement, région de l'Atlantique, EC, Moncton, N.-B.); E. Jonczyk (Beak International Inc., Brampton, Ont.); C. McPherson (EVS Environment Consultants, North Vancouver, C.-B.); J. Pickard (BC Research, Vancouver, C.-B.); Mme D. Rodrigue (Environnement Canada, Gloucester, Ont.); J. Stewart (EVS Environment Consultants, North Vancouver, C.-B); B.J. Unis (HydroQual Laboratories Ltd., Calgary, Alta); et G. van Anggelen (Centre des sciences en environnement du Pacifique, région du Pacifique et du Yukon, EC, North Vancouver, C.-B.)

11.0 Références

CCPA – Conseil canadien de protection des animaux. (1984). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation*. Vol. 2, Ottawa (Ont.).

CCPA – Conseil canadien de protection des animaux. (1993). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation* .Vol. 1, Deuxième édition, Ottawa (Ont.).

CCMRE – Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement. (1987). *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*, Groupe de travail sur les recommandations pour la qualité des eaux, Environnement Canada, Ottawa (Ont.).

EC – Environnement Canada. (1990a). *Méthode d'essai biologique : Essai de létalité aiguë avec la Truite arc-en-ciel*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/9, 51 pages.

EC – Environnement Canada. (1990b). *Méthode d'essai biologique : Essai de létalité aiguë avec* Daphnia *spp*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/11, 57 pages.

EC – Environnement Canada. (1991). *Document d'orientation de surveillance de la précision des essais de toxicité avec des produits toxiques de référence* (préparé par Beak Consultants Ltd.). Institut national de recherche sur les eaux (INRE), Burlington (Ont.).

EC – Environnement Canada. (1992a). *Méthode d'essai biologique : Essai decroissance et de survie sur des larves de Tête-de-boule*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/22, 72 pages. Modifiée en novembre 1997.

EC – Environnement Canada. (1992b). *Méthode d'essai biologique : Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/26, 99 pages. Modifiée en octobre 1998.

EC – Environnement Canada. (1992c). *Méthode d'essai biologique : Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats,* Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/27, 97 pages. Modifiée en novembre 1997.

EC – Environnement Canada. (1992c). *Méthode d'essai biologique : Essai d'inhibition de la croissance de l'algue verte* Selenastrum capricornutum, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/25, 41 pages. Modifiée en novembre 1997.

EC – Environnement Canada. (1997a). *Méthode d'essai biologique : Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans or Chironomus riparius) dans les sédiments*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/32,133 pages.

EC – Environnement Canada. (1997b). *Méthode d'essai biologique : Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole* Hyalella azteca *dans les sédiments*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/33,122 pages.

EC – Environnement Canada. (1997c). *Méthode recommandée pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents pour essais de toxicité sublétale en milieu marin conduits conformément des programmes de suivi des effets sur l'environnement (SEE)*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), 5 pages.

EC – Environnement Canada. (1998a).*Méthode d'essai biologique : Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/35, 60 pages.

EC – Environnement Canada. (1998b). *Méthode d'essai biologique : Essai de toxicité sur les premiers stades de vie de Salmonidés (Truite arc-en-ciel)*, 2e édition, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/28, 60 pages.

EC – Environnement Canada. (1998c). *Document d'orientation pour la surveillance des effets environnementaux sur le milieu aquatique en rapport avec les exigences de la Loi sur les pêcheries*, Environnement Canada, Hull (Qué.), 282 pages.

EC – Environnement Canada. (1998d). *Exigences minimales d'Environnement Canada en matière de rapport – Essai de survie et de croissance des larves de Capucettes*. Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), 2 pages.

EC – Environnement Canada. (1998e). *Exigences minimales d'Environnement Canada en matière de rapport – Essai de survie et de croissance des larves d'Éperlan d'eau douce*, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), 2 pages.

EC – Environnement Canada. (1999). *Méthode d'essai biologique : Essai pour mesurer l'inhibition de croissance du macrophyte dulcicole,* Lemna minor, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), rapport SPE 1/RM/37, 106 pages.

Ingersoll, C.G. et M.K. Nelson. (1990). « Testing Sediment Toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera), pp. 93-109, dans *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, W.G. Landis and W.H. van der Schalle (eds), Volume 13, ASTM SPT 1096, ASTM, Philadelphie PA.

OCDE – Organisation de coopération et de développement économique. (1992). *Les principes de l'OCDE pour les bonnes pratiques de laboratoire*, Collection de l'OCDE sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et la surveillance de la conformité, Numéro 1, Monographie sur l'environnement no 45, OCDE, Paris, France, 29 pages.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1990). *Manual for the Evaluation of Laboratories Performing Aquatic Toxicity Tests*, (Prepared by D.J. Klemm, L.B. Lobring, and W.H. Horning II), Office of Research and Development, Rapport EPA 600/4-90/031, USEPA, Cincinnati, Ohio, 109 pages.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1994). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, 2nd Edition. D.J. Klemm, G.E. Morrison, T.J. Norberg-King, and W.H. Peltier (eds.), Office of Research and Development, Rapport EPA 600/4-91/003, USEPA, Cincinnati, OH, 439 pages.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1995). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms*, G.A. Chapman, D.L. Denton, and J.M. Lazorchak (eds.), Office of Research and Development, Report EPA 600/R-95-136, USEPA, Cincinnati, OH, 661 pages.